

INTERPHASE-FISH-UNTERSUCHUNG DES KLARZELLIGEN
NIERENZELLKARZINOMS ZUR VALIDIERUNG DER
PROGNOSTISCHEN WERTIGKEIT DER REGION 20q12

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Sophie Matthes
geboren am 02.03.1987 in Plauen

Gutachter

1. Frau Prof. Dr. Kerstin Junker, Homburg/Saar
2. Prof. Dr. Iver Petersen, Jena
3. Prof. Dr. Andres Schrader, Ulm

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.04.2013

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	destilliertes Wasser
BAC	bacterial artificial chromosome
BCL2 / BCL2L1	B-cell lymphoma gene 2 / -like 1 (Onkogen)
CA9	carbonic anhydrase IX
CCD	charge-coupled device
CDKN2A/B	cyclin-dependent kinase inhibitor 2 A/B (Tumorsupressorgen)
CGH	comperative genomic hybridization, vergleichende genomische Hybridisierung
CT	Computertomographie
DAPI	4,6 Diamino-2-Phenylindol
DNA	desoxyribonucleic acid
E2F1	E2F transcription factor 1 (Onkogen)
EAU	European Association of Urology
ECOG PS	Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status
EGRF	epidermal growth factor receptor
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GLUT1	glucose transporter 1
HCK	hemapoietic cell kinase (Onkogen)
HCL	Salzsäure
HER2/neu	human epidermal growth factor 2
HGF	hepatocyte growth factor
HIF/HIF1 α	hypoxia inducible factor (1 α)
HMB-45	human melanoma black 45 (Antigen)
ISIS [®]	In Situ Imaging System [®] (Bildanalyseprogramm)
k.A.	keine Angaben
Ki67	Antigen
mdr1	multidrug-resistance transport 1
MET	Onkogen
MgCl	Magnesiumchlorid
MMP9	matrix metallopeptidase 9
MRT	Magnetresonanztomographie

mTOR	mammalian target of rapamycin
MYC	Onkogen
p53	Tumorsupressorprotein
PAC	P1-derived artificial chromosome
PBS	phosphate buffered saline
SSC	standard saline citrate
PDGFβ / PDGFRβ	platelet-derived growth factor β (receptor)
pS6	phosphorylated ribosomal protein S6
PTEN	phosphatase and tensin homolog (Tumorsupressorgen)
Rb	retinoblastoma-associated protein (Tumorsupressorprotein)
ROC	Receiver Operating Characteristic, statistische Methode
SNP	single nucleotide polymorphism
SRC	Protein aus der Familie der Tyrosinkinasen
Tab.	Tabelle
TNFα	transforming growth factor α
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UISS	University of California Los Angeles Integrated Staging System
UKJ	Universitätsklinikum Jena
VEGF / VEGFR	vascular endothelial growth factor (receptor)
VHL	Von-Hippel-Lindau
WHO	World Health Organization
ZNS	zentrales Nervensystem
g	Gramm
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
M	molare Masse, [kg/mol]
N	Normalität (Stoffmengenkonzentration)
nm	Nanometer
μm	Mikrometer
mm	Millimeter
U/min	Umdrehungen pro Minute

Inhalt

	Seite
Zusammenfassung	6
1. Einleitung - Das Nierenzellkarzinom	8
1.1. Epidemiologie	8
1.2. Risikofaktoren	8
1.3. Klassifikation	9
1.3.1. Histologie	9
1.3.2. Histopathologisches Grading (G)	11
1.3.3. TNM-Klassifikation	12
1.4. Genetische Veränderungen	13
1.4.1. Genetische Veränderungen beim klarzelligen Nierenzellkarzinom	13
1.4.1.1. Hereditäre klarzellige Nierenzellkarzinome	13
1.4.1.1.1. Von-Hippel-Lindau- (VHL-) Syndrom	13
1.4.1.1.2. Konstitutionelle Chromosom-3-Translokation	15
1.4.1.2. Genetische Veränderungen beim sporadischen klarzelligen Nierenzellkarzinom	15
1.4.2. Genetische Veränderungen bei anderen histologischen Subtypen des Nierenzellkarzinoms	16
1.5. Diagnose	17
1.6. Therapie	17
1.6.1. Therapie des lokal begrenzten Nierenzellkarzinoms	18
1.6.1.1. Operative Therapie	18
1.6.1.2. Alternativen zur operativen Therapie	19
1.6.1.3. Nachsorge	19
1.6.2. Therapie des lokal fortgeschrittenen und metastasierten Nierenzellkarzinoms	19
1.6.2.1. Immunmodulatorische Therapie	20
1.6.2.2. Molekulare Therapien	20
1.6.2.3. Chirurgische und radiologische Therapie	22
1.7. Prognose	22

2.	Fragestellung	25
3.	Material und Methoden	27
3.1.	Patientenkollektiv und Material	27
3.2.	Methoden	27
3.2.1.	Vergleichende genomische Hybridisierung (comperative genomic hybridisation, CGH)	27
3.2.2.	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	28
3.2.2.1.	Grundlagen der FISH	28
3.2.2.2.	Untersuchungs sonden	29
3.2.2.3.	Durchführung der FISH	30
3.2.2.3.1.	Zellkernpräparation	30
3.2.2.3.2.	Hybridisierung	31
3.2.2.3.3.	Waschschritte	32
3.2.2.4.	Mikroskopische Auswertung	32
3.2.2.5.	Statistische Auswertung und Cut Off Berechnung	32
4.	Ergebnisse	34
4.1.	Tumorklassifikation und Häufigkeiten	37
4.2.	Bestimmung eines Schwellenwertes	37
4.2.1.	Berechnung des Cut-Off-Wertes mit Daten aus den Normalgeweben	37
4.2.2.	Ermitteln eines Schwellenwertes anhand von ROC-Kurven	38
4.3.	Relevanz eines Zugewinns von 20q12 für Metastasierung (M), T-Kategorie (T), Grading (G) und Überleben	39
4.3.1.	Häufigkeit von Zugewinnen	39
4.3.2.	Korrelationsanalysen	40
4.3.2.1.	Korrelation zur Metastasierung (M)	40
4.3.2.2.	Korrelation zu T-Kategorie (T) und Grading (G)	41
4.3.2.3.	Korrelation zum tumorbedingten Tod	41
4.3.3.	Analyse des Überlebens	41
4.3.3.1.	Kaplan-Meier-Methode	41
4.3.3.2.	Cox-Regression	43
4.3.3.3.	Progressionsfreies Überleben	43

4.4.	Auswertung der Gruppe der organbegrenzten Tumoren	44
4.4.1.	Tumorklassifikation und Häufigkeitsverteilung	44
4.4.2.	Schwellenwert	45
4.4.3.	Relevanz eines Zugewinns von 20q12 für Metastasierung (M) und Überleben	45
4.4.3.1.	Häufigkeit von Zugewinnen	45
4.4.3.2.	Korrelationsanalysen	46
4.4.3.2.1.	Korrelation zur Metastasierung (M)	46
4.4.3.2.2.	Korrelation zur T-Kategorie (T) und Grading (G)	47
4.4.3.2.3.	Korrelation zum tumorbedingten Tod	47
4.4.3.3.	Analyse des Überlebens	47
4.4.3.3.1.	Kaplan-Meier-Methode	47
4.4.3.3.2.	Cox-Regression	48
4.4.3.3.3.	Progressionsfreies Überleben	49
4.5.	Korrelation mit den Ergebnissen der Array-CGH	49
5.	Diskussion	50
5.1.	Relevanz der untersuchten Region für die Prognosebewertung	50
5.2.	Relevanz der untersuchten Region für Tumorgenese und -progression	52
5.3.	Methodik: Vergleich zu den Ergebnissen der Array-CGH, mögliche Probleme bei der Auswertung	56
5.4.	Klinische Relevanz der Ergebnisse	58
5.5.	Ausblick	59
6.	Schlussfolgerung	60
	Literaturverzeichnis	61
	Anhang	
	Lebenslauf	70
	Danksagung	71
	Ehrenwörtliche Erklärung	72

Zusammenfassung

Der Krankheitsverlauf beim klarzelligen Nierenzellkarzinom ist hoch variabel und trotz der Etablierung integrierter Prognosemodelle in den vergangenen Jahren ist die individuelle Beurteilung der Prognose nicht zufriedenstellend möglich. Mehr als 60 Prozent der Nierentumoren werden heute als Zufallsbefund meist im frühen Krankheitsstadium diagnostiziert. Für diese Patienten ist eine Einschätzung der Aggressivität des Tumors hinsichtlich des Resektionsumfangs und der Nachsorgeplanung notwendig. Aber auch bei metastasierten Tumoren wäre eine Vorhersage des Ansprechens auf die seit einigen Jahren eingesetzten molekularen Therapien hilfreich. Bisher existieren jedoch keine molekularen Marker, die eine individuelle Prognosebewertung oder Prädiktion ermöglichen.

In vorangegangenen Studien des Forschungslabors der Klinik für Urologie des UKJ wurden mittels Array-CGH mehrere spezifische chromosomale Aberrationen beim klarzelligen Nierenzellkarzinom identifiziert, die mit dem klinischen Verlauf, insbesondere mit der Metastasierung, korrelierten. Eine dieser Veränderungen war der Zugewinn der Region 20q11.21q13.32. Ziel dieser Arbeit war es, die prognostische Wertigkeit dieser Veränderung durch Anwendung der FISH zu validieren.

Die FISH wurde an isolierten Zellkernen aus Gewebeproben von 58 primären klarzelligen Nierenzellkarzinomen - davon 29 nicht metastasiert und 29 metastasiert - durchgeführt. Dazu wurden jeweils 3 spezifische Sonden appliziert: eine regionenspezifische Sonde für die zu untersuchende Region 20q12, eine weitere regionenspezifische Sonde für den Locus 20q11 als Kontrolle, ob ein isolierter Zugewinn von 20q12 oder ein Zugewinn des gesamten Chromosomenarms bzw. Chromosoms vorliegt und eine Zentromersonde für Chromosom 2 als Polyploidiekontrolle.

Zugewinne wurden bei insgesamt 31 % der untersuchten Tumoren gefunden. Ein Zugewinn der Region 20q12 war signifikant mit der Metastasierung (Exakter Test nach Fisher, $p=0,001$), dem tumorbedingten Tod (Exakter Test nach Fisher, $p=0,022$) und der T-Kategorie (Chi-Quadrat nach Pearson, $p=0,035$) assoziiert. Die Analyse des Überlebens ergab ein signifikant schlechteres Outcome für Patienten, deren Tumor einen Zugewinn aufwies (Log-Rank-Test, $p=0,001$). Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug in der Gruppe der Patienten mit Zugewinn 50 %, bei den Patienten ohne Zugewinn dagegen 80 %. Das Risiko zur Entwicklung von

Metastasen bei primär nicht metastasierten Tumoren war bei einem Zugewinn von 20q12 erhöht (Log-Rank-Test, $p=0,001$). Auch für die Gruppe der organbegrenzten Tumoren (bis einschließlich T2) ergab sich eine signifikante Korrelation zur Metastasierung (Exakter Test nach Fisher, $p=0,015$) und ein schlechteres Outcome in der Überlebensanalyse (Log-Rank-Test, $p=0,012$) bei einem Zugewinn von 20q12. Die Ergebnisse der FISH bestätigten die Array-CGH-Resultate. Es fand sich eine signifikante Korrelation zwischen beiden Methoden (Korrelation nach Pearson von 0,563, $p=0,000$).

Gemäß den Ergebnissen dieser Arbeit spielen Zugewinne der Region 20q12 eine entscheidende Rolle für die Tumorprogression und -aggressivität beim klarzelligen Nierenzellkarzinom. In der Literatur werden auch bei anderen Tumorentitäten, so zum Beispiel beim Kolon- und beim Mammakarzinom, prognoserelevante Veränderungen von 20q beschrieben. Potentielle Onkogene auf diesem Lokus sind E2F1, MMP9, HCK und BLC2L1. Weiterführende prospektive Studien sind zur Bestätigung der Ergebnisse sowie zur Identifikation von Kandidatengenen nötig.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass anhand von genetischen Veränderungen des Primärtumors eine Aussage über die Prognose des klarzelligen Nierenzellkarzinoms getroffen werden kann. Es erscheint möglich, in Kombination mit anderen spezifischen chromosomalen Aberrationen ein FISH-Sondenset zu entwickeln, welches in der Routinediagnostik eingesetzt werden kann.

1. Einleitung - Das Nierenzellkarzinom

Das folgende Kapitel fasst grundlegende Informationen zum Nierenzellkarzinom zusammen. Ein besonderer Schwerpunkt soll - dem Thema der Arbeit entsprechend - auf den genetischen Veränderungen bei diesem Tumor und deren Bedeutung für Diagnose, Therapie und Prognosebewertung liegen.

1.1. Epidemiologie

Maligne Neubildungen der Niere repräsentieren in Deutschland etwa 3 % aller Krebserkrankungen. Die Nierenzellkarzinome treten dabei im Erwachsenenalter mit einem Anteil von 90 % am häufigsten auf. Sie stellen die dritthäufigste urologische maligne Erkrankung nach Prostata- und Harnblasenkarzinom dar. Im Jahr 2008 erkrankten in Deutschland mehr als 14 000 Menschen an einem Nierentumor. Die Inzidenz betrug in diesem Jahr 16,6/100 000 beim Mann und 8,2/100 000 Einwohner bei der Frau. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei 68 (Männer) bzw. 71 (Frauen) Jahren. Die Mortalität betrug für Männer 5,2/100 000 und für Frauen 2,4/100 000 Einwohner. (RKI und GEKID 2012) In den europäischen Ländern konnte bis Mitte der 90er Jahre eine starke Zunahme der Inzidenz beobachtet werden. Seitdem ist die Zahl der Neuerkrankungen konstant bzw. leicht rückläufig. Ein ähnlicher Verlauf ist für die Mortalität zu verzeichnen. (Levi et al. 2008)

1.2 Risikofaktoren

Als prädisponierend für die Entstehung des Nierenzellkarzinoms werden vor allem Einflüsse des Lebensstils diskutiert. Es gilt als gesichert, dass Rauchen, Übergewicht und arterielle Hypertonie das Risiko erhöhen. Dieses steigt dabei mit der Anzahl gerauchter Zigaretten pro Tag bzw. je höher die Blutdruckwerte liegen. Sowohl Nikotinkarenz als auch die erfolgreiche Behandlung einer Hypertonie senken in der Langzeitbeobachtung das Erkrankungsrisiko wieder. (Hunt et al. 2005, Weikert et al. 2008, Chow et al. 2000) Adipositas ist ein unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung des Nierenzellkarzinoms, stellt aber paradoxerweise bei Erkrankung einen Überlebensvorteil dar, insbesondere im organbegrenzten Tumorstadium. (Waalkes et al. 2011) Umstritten ist der Einfluss der Ernährung. Der Verzehr von Obst und Gemüse wird in verschiedenen Studien entweder als protektiv oder aber als unbedeutend für die Entstehung des Nierenzellkarzinoms bewertet.

(Lee et al. 2009, Weikert et al. 2006) Keine Bedeutung konnte für eine fett- oder proteinreiche Ernährung nachgewiesen werden. (Lee et al. 2008)

Chronische Nierenerkrankungen, die zur Dialyse führen, sind mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung des Nierenzellkarzinoms assoziiert. Dies gilt im Besonderen für Patienten, die schon in jungen Jahren dialysepflichtig werden. (Maisonnette et al. 1999) Auch Diabetes mellitus wird als Risikofaktor gewertet, allerdings konnte die Unabhängigkeit von anderen Einflüssen wie dem Übergewicht nicht nachgewiesen werden. (Lindblad et al. 1999) Hormonelle Faktoren könnten auch eine Ursache dafür sein, dass bei Frauen mit mindestens einer Schwangerschaft im Vergleich zu Nullipara eine erhöhte Inzidenz an Nierenzellkarzinomen beobachtet wurde. Aber auch die schwangerschaftsinduzierte Hypertonie wird hier als Einflussgröße vermutet. (Kabat et al. 2007)

Obwohl das Nierenzell- im Gegensatz zum Harnblasenkarzinom nicht zu den Berufskrankheiten zählt, wird für einige Berufsgruppen und Chemikalien ein ätiologischer Zusammenhang angenommen. Dazu gehört die Exposition mit chlorierten Lösungsmitteln, insbesondere von Trichlorethylen. Erhöhte Inzidenzen sind auch bei Arbeitern in der Schwermetallindustrie zu beobachten, wobei nephrotoxische Effekte von Cadmium und Blei als ursächlich angenommen werden. Auch Asbest wird als Risikofaktor vermutet. Bei Beschäftigten in der Textilindustrie (Färber, Gerber) wurde ebenfalls ein erhöhtes Risiko für die Entstehung des Nierenzellkarzinoms beobachtet. Hier wird die Rolle der aromatischen Amine diskutiert. (Pesch et al. 2000) Unterschiedlich bewertet wird auch der Einfluss von Medikamenten, vor allem von Diuretika (Grossman et al. 1999) und Analgetika. Die als kanzerogen bekannten phenacetinhaltigen Analgetika wurden in den 80er Jahren vom Markt genommen. Über ein erhöhtes Risiko bei chronischer Einnahme anderer Nicht-Opioid-Analgetika gibt es widersprüchliche Ergebnisse. (McCredie et al. 1995, Gago-Dominguez et al. 1999)

1.3. Klassifikation

1.3.1. Histologie

Die histologische Klassifikation der WHO von 2004 berücksichtigt sowohl die Pathologie als auch genetische Veränderungen, die charakteristisch für den jeweiligen histologischen Typ sind. Eine Übersicht der Klassifikation ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1: WHO-Klassifikation der Nierentumoren, modifiziert nach Lopez-Beltran 2006

histologischer Subtyp	typische genetische Veränderungen
Maligne Nierenzelltumoren	
klarzelliges Nierenzellkarzinom	-3p, +5q22, -6q, -8p, -9p, -14q
multilokuläres klarzelliges Nierenzellkarzinom	VHL-Genmutation
papilläres Nierenzellkarzinom	+3q, +7, +8, +12, +16, +17, +20, -Y
chromophobes Nierenzellkarzinom	-1, -2, -6, -10, -17, -21, Hypodiploidie
Sammelrohrkarzinom (Ductus-Bellini-Karzinom)	-1q, -6p, -8p, -13q, -21q, -3p (selten)
renales medulläres Karzinom	unbekannt
Karzinom mit Xp11-Translokation	t(X; 1)(p11.2; q21), t(X; 17)(p11.2; q25) und weitere
Neuroblastom-assoziiertes Karzinom	Allelimbalance von 20q13
muzinöses tubuläres - und Spindelzellkarzinom	-1, -4, -6, -8, -13, -14, +7, +11, +16, +17
nicht klassifiziertes Nierenzellkarzinom	unbekannt
Benigne Nierenzelltumoren	
papilläres Adenom	ähnlich wie papilläres Nierenzellkarzinom
Onkozytom	-1, -14, Alterationen der mitochondrialen DNA

Sarkomatoide Veränderungen können bei allen Typen vorkommen. Sie werden nicht als eigene Kategorie angesehen, sondern als schlecht differenzierte Variante des jeweiligen Subtyps und damit als Zeichen einer fortgeschrittenen Erkrankung. Unter allen operierten Neubildungen der Niere macht das klarzellige Nierenzellkarzinom mit 75 % den größten Anteil aus. Danach folgen das papilläre Nierenzellkarzinom mit 10 %, das chromophobe - mit 5 % und das Sammelrohrkarzinom mit 1 %. In etwa 4 bis 6 % der Fälle handelt es sich um ein nicht klassifizierbares Nierenzellkarzinom. Das benigne Onkozytom lässt sich durch bildgebende Diagnostik nicht definitiv vom Karzinom abgrenzen und wird wie dieses chirurgisch behandelt, sodass ca. 5 % der operierten Nierentumoren Onkozytome sind. (Kovacs et al. 1997, Lopez-Beltran et al. 2006)

1.3.2. Histopathologisches Grading (G)

Eine allgemein akzeptierte und angewandte Einteilung für das Grading der Nierenzellkarzinome ist die in der nachfolgenden Tabelle 2 dargestellte Fuhrman-Klassifikation. (Fuhrman et al. 1982)

Tab. 2: Grading der Nierenzellkarzinome nach Fuhrman et al. 1982

G - Grading		
GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden	
G1	gut differenziert	kleine (ca. 10 µm), runde, gleichförmige Zellkerne, unauffällige oder fehlende Nucleoli
G2	mäßig differenziert	größere (ca. 15 µm) Zellkerne mit Unregelmäßigkeiten in der Kontur, Nucleoli sichtbar bei hoher Vergrößerung (400x)
G3-4	gering differenziert/ undifferenziert	große (20 µm) Zellkerne mit deutlich unregelmäßiger Kontur, teilweise lobulär, markante, große Nucleoli auch bei niedriger Vergrößerung (100x), Chromatinklumpen

1.3.3. TNM-Klassifikation

Die klinische Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms erfolgte in der vorliegenden Arbeit nach der TNM-Klassifikation der UICC von 2002 (siehe Tabelle 3). (Wittekind 2002)

Tab. 3: TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinoms der UICC 2002

T - Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor 7,0 cm oder weniger in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T1a	Tumor 4,0 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T1b	Tumor mehr als 4,0 cm, aber nicht mehr als 7,0 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 7,0 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T3	Tumor breitet sich in größeren Venen aus oder infiltriert direkt Nebenniere oder perirenales Gewebe, jedoch nicht über die Gerota-Faszie hinaus
T3a	Tumor infiltriert direkt Nebenniere oder perirenales Gewebe ¹ , aber nicht über die Gerota-Faszie hinaus
T3b	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Nierenvene(n) ² oder V. cava (einschließlich Wandbefall) unterhalb des Zwerchfells
T3c	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in V. cava (einschließlich Wandbefall) oberhalb des Zwerchfells
T4	Tumor infiltriert über die Gerota-Faszie hinaus
¹ Schließt peripelvines Fettgewebe mit ein. ² Schließt segmentale Äste (mit muskulärer Wand) mit ein.	
N - Regionale Lymphknoten¹	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in einem regionären Lymphknoten
N2	Metastase(n) in mehr als einem regionären Lymphknoten
¹ Hiläre sowie abdominale paraaortale und parakavale Lymphknoten. Die Seitenlokalisation beeinflusst die N-Klassifikation nicht.	
M - Fernmetastasen	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Die aktuelle Klassifikation der UICC aus dem Jahr 2009 weist einige Änderungen zur Version von 2002 auf. So wird in eine Kategorie T2a (Tumoren > 7 cm, aber ≤ 10 cm) und T2b (Tumoren > 10cm, auf die Niere begrenzt) unterschieden. Karzinome, die einen

Tumorthrombus nur bis in die Nierenvene bilden, zählen nun zur Kategorie T3a. Hingegen wird die mit einer schlechten Prognose assoziierte Invasion der Nebenniere als T4 eingestuft. (Ljungberg et al. 2010, <http://www.uicc.org/tnm>)

1.4. Genetische Veränderungen

1.4.1. Genetische Veränderungen beim klarzelligen Nierenzellkarzinom

1.4.1.1. Hereditäre klarzellige Nierenzellkarzinome

Etwa 4 % aller Nierenzellkarzinome treten im Rahmen einer genetischen Prädisposition auf. (Linehan et al. 1995) Kennzeichnend für alle erblichen Nierenzellkarzinome ist ihr multifokales und bilaterales Auftreten sowie das junge Erkrankungsalter der Patienten.

1.4.1.1.1 Von Hippel-Lindau-(VHL-) Syndrom

Dieses autosomal dominant vererbte Tumorsyndrom ist durch die Manifestation hoch vaskularisierter Tumoren im ZNS, den Nieren und Nebennieren, dem Pankreas und den reproduktiven Geschlechtsorganen gekennzeichnet. Das VHL-Syndrom tritt mit einer Inzidenz von 1 : 36 000 auf. Die Penetranz liegt im Alter von 65 Jahren bei über 90 %. In der Niere können sowohl benigne Zysten als auch klarzellige Nierenzellkarzinome entstehen. Nierenzellkarzinome stellen mit einer Häufigkeit von 24 bis 45 % der Patienten die wesentliche maligne Manifestation des VHL-Syndroms dar. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 39 Jahren. Die häufigste Erstmanifestation der Erkrankung sind retinale Hämangioblastome, für die das mittlere Erkrankungsalter 25 Jahre beträgt. Bei 60 bis 80 % der Patienten treten Hämangioblastome des ZNS, insbesondere des Kleinhirns, des Hirnstamms und des Rückenmarks, auf. Desweiteren finden sich endolymphatische Zystadenome, Phäochromozytome, Pankreaszysten, Inselzellkarzinome sowie Zystadenome des Nebenhodens bzw. des Ligamentum rotundum. Das Verteilungsmuster unterscheidet sich zwischen den betroffenen Familien. Anhand des Vorhandenseins oder Fehlens von Phäochromozytomen wird die VHL-Erkrankung in zwei Gruppen unterteilt (siehe Tabelle 4). (Lonser et al. 2003)

Tab. 4: Formen des VHL-Syndroms, modifiziert nach Lonser et al. 2003

Typ 1	Nierenzellkarzinome retinale Hämangioblastome Hämangioblastome des ZNS Pankrasyzen oder -neoplasien
Typ 2A	Phäochromozytome retinale Hämangioblastome Hämangioblastome des ZNS
Typ 2B	Phäochromozytome Nierenzellkarzinome retinale Hämangioblastome Hämangioblastome des ZNS Pankrasyzen oder -neoplasien
Typ 2C	ausschließlich Phäochromozytome

In allen betroffenen Familien werden Keimbahnmutationen im VHL-Tumorsupressorgen auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 (3p25-26) nachgewiesen, welches für das VHL-Protein codiert. Dieses befindet sich zellzyklusabhängig im Zellkern oder im Zytoplasma und bildet mit den Proteinen Elongin B und C sowie Cullin 2 einen Komplex, der die ubiquitinabhängige Proteolyse zellulärer Proteine vermittelt. Ein Zielmolekül ist HIF (hypoxia inducible factor) 1 und 2, an dessen α -Untereinheit das VHL-Protein bindet. HIF ist ein Regulatorprotein der hypoxischen Antwort der Zelle, das unter Normalbedingungen durch Bindung an VHL destabilisiert ist bzw. der Proteolyse zugeführt wird. Unter Hypoxie, aber auch in Tumorzellen mit abnormer oder fehlender VHL-Funktion akkumuliert HIF dagegen. Aktiviertes HIF ist ein Transkriptionsfaktor für VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF β (platelet derived growth factor β), TNF α (transforming growth factor α) und GLUT1 und stimuliert so Zellproliferation und Angiogenese. Zellen mit einem Mangel an VHL verhalten sich so auch unter Normalbedingungen wie unter Hypoxie. Dieser Zusammenhang erklärt die hohe Vaskularisierung der mit einer VHL-Mutation assoziierten Tumoren. Außerdem führt eine Fehlfunktion von VHL auch direkt - unabhängig von HIF - zur Überexpression von Angiogenese- und Wachstumsfaktoren. (siehe auch schematische Darstellung in Abbildung 1 unter 1.6.2.2.) Das VHL-Gen wurde 1993 identifiziert. Bisher sind über 160 verschiedene Mutationen bekannt, darunter Missense- und Nonsensemutationen sowie Deletionen und Insertionen. (Decker und Brauch 2002, Lonser et al. 2003, Cohen und McGovern 2005)

1.4.1.1.2. Konstitutionelle Chromosom-3-Translokation

Eine seltene familiäre Form des klarzelligen Nierenzellkarzinoms ist durch eine balancierte Translokation von Chromosom 3 charakterisiert. Die Bruchpunkte unterscheiden sich zwischen den betroffenen Familien. Ein 3-Stufen-Modell geht davon aus, dass für die Entstehung eines Nierenzellkarzinoms neben der konstitutionellen Translokation auch der Verlust des derivativen Chromosoms sowie eine zusätzliche somatische Mutation auf dem unbeteiligten Chromosom Voraussetzung sind. (Bodmer et al. 2002)

1.4.1.2. Genetische Veränderungen beim sporadischen klarzelligen Nierenzellkarzinom

Auch bei sporadischen klarzelligen Tumoren liegt in 57 % der Fälle eine Mutation im VHL-Gen vor. 98 % davon zeigen einen Verlust der Heterozygotie. Die Veränderungen sind gleich häufig in frühen und fortgeschrittenen Tumorstadien nachweisbar, was für eine Beteiligung von VHL-Mutationen an der Tumorentstehung spricht. Weiterhin fällt auf, dass die somatischen Mutationen in etwa der Hälfte der Fälle in Exon 2 auftreten, welches bei der familiären Form kaum betroffen ist. Dies lässt auf den Einfluss von Umweltfaktoren bei der Kanzerogenese schließen. Mutationen von VHL sind hochspezifisch für das klarzellige Nierenzellkarzinom, sie werden weder bei anderen histologischen Typen des Nierenzellkarzinoms noch bei anderen malignen Tumoren beobachtet. (Gnarra et al. 1994, Kovacs et al. 1997) Zytogenetisch findet sich ein Verlust von 3p bei mehr als 90 % der sporadischen Nierenzellkarzinome. Mit geringerer Häufigkeit treten zahlreiche weitere Veränderungen auf, so Zugewinne von 1q, 2q, 5q, 7q, 8q, 12p und 20q sowie Verluste von 1p, 4q, 6q, 8p, 9p und 14q. Bekannte Tumorsuppressorgene sind CDKN2A und CDKN2B auf Chromosom 9p, ein bekanntes Onkogen ist MYC in der Region 8q. Die Funktion der betroffenen Gene in anderen Regionen ist noch unzureichend geklärt. (Beroukhir et al. 2009) Ein Verlust von 9p ist mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. (Brunelli et al. 2008) Patienten mit einem Verlust von 5q im Tumorgewebe zeigen dagegen ein längeres Gesamtüberleben als Patienten ohne diese Veränderung. (Gunawan et al. 2001) Im Gegensatz zum Verlust von 3p treten diese Aberrationen erst in fortgeschrittenen Tumorstadien auf, was nahelegt, dass sie eher an der Progression als an der Tumorentstehung beteiligt sind. (Anglard et al. 1991)

1.4.2. Genetische Veränderungen bei anderen histologischen Subtypen des Nierenzellkarzinoms

Beim papillären Nierenzellkarzinom zeigen sich ebenfalls charakteristische genetische Veränderungen, vor allem Trisomien der Chromosomen 7 und 17 und Verluste des Y-Chromosoms. Nach histologischen, klinischen und zytologischen Kriterien wird in zwei Subgruppen unterteilt: So treten bei Typ 1 zu nahezu 100 % Zugewinne der Chromosomen 7 und 17 auf, während diese Veränderungen beim mit einer schlechteren Prognose assoziierten Typ 2 seltener sind. (Jiang et al. 1998)

Das papilläre Nierenzellkarzinom tritt auch in einer hereditären, autosomal dominanten Form auf, die durch multifokale, bilaterale Typ-1-Karzinome gekennzeichnet ist. Dabei ist ausschließlich die Niere betroffen. Die Tumoren zeigen eine hohe Penetranz. Als Ursache für dieses Tumorsyndrom konnten Keimbahnmutationen im met-Onkogen auf dem Lokus 7q31 nachgewiesen werden. met, eine transmembrane Tyrosinkinase, ist Rezeptor für den Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF). Missensemutationen in der Tyrosinkinasedomäne führen zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung.

Bei der hereditären Leiomyomatose treten neben kutanen und uterinen Leiomyomen selten auch aggressive papilläre Typ-2-Karzinome oder Sammelrohrkarzinome auf, die oft solitär und unilateral lokalisiert sind. Es wurden Mutationen im Fumarat-Hydratase-Gen (1q42-44) nachgewiesen, wodurch es zur - VHL-unabhängigen - Aktivierung von HIF kommt.

Chromophobe Nierenzellkarzinome, Onkozytome und sehr selten auch klarzellige Nierenzellkarzinome kommen im Rahmen des Bird-Hogg-Dubé-Syndroms vor, einem autosomal dominanten Tumorsyndrom, welches abgesehen von den Nierentumoren durch das Auftreten von kutanen Fibrofollikulomen und pulmonalen Zysten mit der Entstehung eines Pneumothorax gekennzeichnet ist. (Rosner et al. 2009)

Erbliche Nierenzellkarzinome treten außerdem bei der Tuberösen Sklerose auf, einer Systemerkrankung, die sich durch Hamatome in Herz, Gehirn, Lunge und Haut auszeichnet. Manche der Betroffenen entwickeln renale Läsionen, bei denen es sich meist um Angiomyolipome, selten auch um klarzellige Nierenzellkarzinome handelt. Diese exprimieren das HMB-45-Antigen, einem Marker für Melanome und Tumoren der Neuralleiste. Dieser wird auch von sporadischen Angiomyolipomen exprimiert, was einen Zusammenhang

zwischen Angionmyolipomen und Nierenzellkarzinomen vermuten lässt. (Decker und Brauch 2002)

1.5. Diagnose

Ein Großteil der Nierenzellkarzinome ist im Frühstadium asymptomatisch. Unspezifische klinische Symptome wie Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust sowie Unwohlsein und Tumoranämie und durch Metastasen bedingter persistierender Husten oder Knochenschmerzen können als Erstsymptome auftreten. (Ljungberg et al. 2010) Beim Nierenzellkarzinom werden paraneoplastische Syndrome in fast allen Organsystemen beobachtet, dazu zählen Hyperkalzämie, Hypertonie, Polyzythämie und Erythrozytose, Leberfunktionsstörungen (Stauffer-Syndrom), Polyneuropathie, Myopathie und Amyloidose. Im Spätstadium wird die „klassische Trias“ aus Hämaturie, palpablem Tumor und Flankenschmerz beschrieben. (Bedke et al. 2007) Heute werden jedoch durch die weit verbreitete Anwendung bildgebender Verfahren bis zu 60 % aller Nierenzellkarzinome präsymptomatisch als Zufallsbefunde entdeckt.

Auch die endgültige Diagnose stützt sich hauptsächlich auf die Bildgebung. Der Sonographie kommt als Basisdiagnostik bei Verdacht auf eine renale Raumforderung ein hoher Stellenwert zu. Methode der Wahl für Diagnose und Staging ist die Computertomographie. Die MRT hat eine ähnlich gute Präzision wie die CT und ermöglicht bessere Aussagen über das Vorhandensein von Tumorthromben. (Coll und Smith 2007)

Bei der körperlichen Untersuchung sollte auf einen palpablen abdominalen Tumor sowie eine Varikozele und Ödeme der unteren Extremität als Zeichen eines fortgeschrittenen Tumorstadiums geachtet werden. Zur regulären Labordiagnostik gehören neben den Nierenfunktionswerten auch Hämoglobin, Blutsenkungsgeschwindigkeit, C-reaktives Protein sowie Serumcalcium und alkalische Phosphatase, deren Erhöhung ein Hinweis auf Knochenmetastasen sein kann. Bislang ist kein spezifischer Tumormarker für das Nierenzellkarzinom bekannt. (Ljungberg et al. 2010, Decker und Brauch 2002)

1.6. Therapie

Das wichtigste Kriterium für die Therapieentscheidung ist die Differenzierung zwischen lokal begrenztem und lokal fortgeschrittenem bzw. metastasiertem Befund.

1.6.1. Therapie des lokal begrenzten Nierenzellkarzinoms

1.6.1.1. Operative Therapie

Die chirurgische Therapie bietet den einzigen kurativen Ansatz in der Behandlung des Nierenzellkarzinoms. Galt noch vor wenigen Jahren die radikale Tumornephrektomie mit Entfernung der gleichseitigen Nebenniere und der regionalen Lymphknoten als Therapie der Wahl, so wird heute zunehmend individueller entschieden und es wird versucht, organerhaltend zu operieren.

Für Tumoren der T-Kategorie T1a unterscheidet sich das onkologische Outcome zwischen radikaler Nephrektomie und organerhaltender Operation nicht. Im Gesamtüberleben wird jedoch ein Nachteil für die radikale Nephrektomie beschrieben. Patienten, die mit dieser Methode behandelt werden, zeigen eine höhere Sterblichkeit an nicht durch den Tumor bedingten Ursachen. (Zini et al. 2009, Thompson et al. 2009) Der Verlust an Nierenfunktion ist bei radikaler Resektion wesentlich größer und erhöht das Risiko zur Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz. (Huang et al. 2006) Insbesondere wurde eine durch postoperative Niereninsuffizienz bedingte vermehrte kardiovaskuläre Mortalität beobachtet. (Weight et al. 2010) Dementsprechend wird für Tumoren der T-Kategorie T1a, bei ausgewählten Patienten zunehmend auch für T1b und T2, die offene organerhaltende Resektion als Standardtherapie empfohlen. Eine absolute Indikation für den Organerhalt stellt eine anatomische oder funktionelle Einzelniere dar. Relative Indikationen sind eine funktionell beeinträchtigte Gegenniere oder ein hereditäres Tumorleiden mit einem erhöhten Rezidivrisiko. Für größere Tumoren ist die radikale Nephrektomie Standard. (Ljungberg et al. 2010)

Die Resektion der ipsilateralen Nebenniere ist bei unauffälligem präoperativen CT nicht indiziert. (Leibovitch et al. 1995) Kein Konsens existiert derzeit über den Umfang der Lymphknotenresektion. Basierend auf den aktuellen Daten kann bei kleinen, organbegrenzten Tumoren ohne assoziierte Lymphadenopathie auf eine aggressive Dissektion verzichtet werden. Dagegen zeigte diese einen prognostischen Vorteil für Patienten mit klinisch positiver Lymphknotenmetastasierung. (Margulis und Wood 2008) Eine adjuvante Therapie mit Zytokinen oder Tumorimpfstoffen verbessert das Überleben nicht und ist außerhalb klinischer Studien nicht indiziert. (Ljungberg et al. 2010)

1.6.1.2. Alternativen zur operativen Therapie

Optionen für eine nicht chirurgische Behandlung des Nierenzellkarzinoms stellen minimalinvasive Methoden wie Kryo- und Hochfrequenzablation sowie die aktive Beobachtung dar. Für keine dieser Möglichkeiten existieren bisher Daten über die Langzeitwirksamkeit. Kryo- und Hochfrequenzablation haben, verglichen mit der organerhaltenden Resektion, eine höhere Rate an Lokalrezidiven. Betrachtet man die Entwicklung von Fernmetastasen, zeigt keiner der alternativen Therapieansätze einen Unterschied zur organerhaltenden Operation. (Kunkle et al. 2008) Zielgruppe für minimalinvasive Verfahren sind ältere Patienten mit zufällig diagnostizierten kleinen Tumoren, einem hohen Operationsrisiko oder multiplen Tumoren, sowie mit einem hohen Risiko für eine postoperative Niereninsuffizienz bei einer Einzelniere. Die initiale Beobachtung mittels bildgebender Verfahren kann bei Patienten mit kleinen Raumforderungen und einem geringen Risiko zur Metastasierung eine Alternative sein. (Ljungberg et al. 2010)

1.6.1.3. Nachsorge

Es existiert kein einheitlicher Algorithmus für die postoperative Nachsorge beim Nierenzellkarzinom. Eine Nachbeobachtung ist jedoch zur Überwachung der Nierenfunktion und zur frühen Erkennung von Lokalrezidiven und Metastasen von Bedeutung. Die Frequenz und der Umfang der Nachsorge sollten optimaler Weise dem individuellen Risikoprofil des Patienten angepasst werden. (Ljungberg et al. 2010)

1.6.2. Therapie des lokal fortgeschrittenen und metastasierten Nierenzellkarzinoms

Das Nierenzellkarzinom ist chemo- und strahlentherapieresistent. Als Ursache für das fehlende Ansprechen auf Chemotherapeutika wird die hohe Expression des *mdr1*-Gens (multidrug resistance transport) in den Zellen des proximalen Tubulus vermutet. Dieses codiert für einen P-Glykoprotein-Transporter, durch den Fremdstoffe - wie auch viele Chemotherapeutika - wieder aus der Zelle befördert werden. (Decker und Brauch 2002) Alternativen in der systemischen Therapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms stellen die immunmodulatorische Therapie und die seit wenigen Jahren eingesetzten molekularen Therapien dar.

1.6.2.1. Immunmodulatorische Therapie

Anfangs vielversprechend, zeigten sich in klinischen Studien ernüchternde Ergebnisse für die Monotherapie mit immunmodulatorischen Substanzen mit niedrigen Ansprechraten (die Remissionsrate lag bei durchschnittlich 12,4 %) und einem geringen Überlebensvorteil nur für Interferon α . Durch Behandlung mit Interleukin 2 konnte dagegen kein Überlebensvorteil erreicht werden. Zudem ist diese Therapie mit starken Nebenwirkungen assoziiert. (Coppin et al. 2005) Beide Medikamente werden in Kombination mit molekularen Therapien eingesetzt (siehe Tabelle 5).

Experimentelle, nicht zur Standardtherapie zählende Ansätze sind die allogene Stammzelltransplantation und die Tumorstimulation. Durch die Verabreichung autologer Tumorstoffe nach Nephrektomie konnte beim lokal begrenzten Nierenzellkarzinom eine Verzögerung der Progression erreicht werden. (Jocham et al. 2004) Ziel der Transplantation allogener Lymphozyten von einem gesunden Spender ist es, analog zur in der Leukämiebehandlung genutzten graft-versus-leukemia Reaktion einen graft-versus-tumour-Effekt zu erzeugen. Komplette und partielle Remissionen wurden erreicht, aber es waren auch beträchtliche Nebenwirkungen der Therapie zu verzeichnen. (Childs et al. 2000)

1.6.2.2. Molekulare Therapien

Jüngste Erkenntnisse über die molekularbiologischen Grundlagen in der Genese des Nierenzellkarzinoms (siehe 1.4.1.1.1.) haben in den vergangenen zehn Jahren zur Entwicklung von Substanzen geführt, die gezielt auf an der Tumorentstehung und -progression beteiligte Signalwege wirken. Die wichtigsten sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Die Tyrosinkinaseinhibitoren Sorafenib, Sunitinib und Pazopanib hemmen den VEGF- und PDGF β -Rezeptor. Auf den gleichen Signalweg wirkt Bevacizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF. Einen weiteren wichtigen Ansatzpunkt stellt mTOR (mammalian target of rapamycin) dar, welches die Proteintranslation von HIF reguliert und von Sirolimus, dem Metaboliten von Temsirolimus und Everolimus, spezifisch gehemmt wird. (Brugarolas 2007)

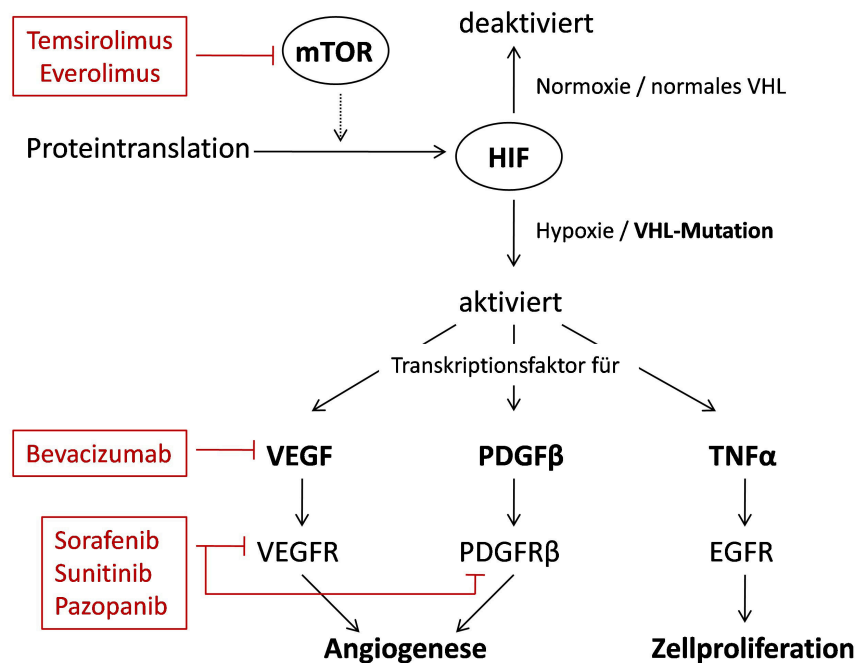


Abb. 1: Schematische Darstellung der Signalwege der Tumorgenese und Ansatzpunkte für Medikamente; modifiziert nach Burgarolos 2007

In der kurzen klinischen Praxis haben die molekularen Therapien Vorteile gegenüber den bisherigen Therapieoptionen gezeigt, jedoch keine ausgeprägte Verlängerung des Gesamtüberlebens. (Coppin et al. 2008) Bei Behandlung mit Sunitinib als first-line-Therapie konnten gegenüber der Interferon- α -Therapie ein verlängertes progressionsfreies Überleben und eine höhere Remissionsrate (47 % versus 12 %) erreicht werden. (Motzer et al. 2007) Mit Sorafenib wurde bei Patienten mit Therapieversagen bei immunmodulatorischen Therapien ebenfalls eine verzögerte Progression der Erkrankung im Vergleich zu einer Placebo-Gruppe beobachtet. (Escudier et al. 2007b) Auch Patienten, die mit Pazopanib behandelt wurden, hatten eine gegenüber der placebokontrollierten Vergleichsgruppe verzögerte Progression. Dies traf sowohl auf zytokinvorbehandelte als auch auf davor nicht systemisch behandelte Patienten zu. (Sternberg et al. 2010) Bevacizumab zeigte im Vergleich zu Interferon α 2a als first-line-Therapie ein verlängertes progressionsfreies Überleben und höhere Ansprechraten (31 % versus 13 %). (Escudier et al. 2007a) Temsirolimus konnte als bisher einzige Substanz einen Vorteil im Gesamtüberleben aufweisen (medianes Überleben 10,9 Monate bei Temsirolimus versus 7,3 Monate bei Interferon α). Die Substanz wurde als first-line-Therapie gegenüber Interferon α in einer Gruppe von Patienten mit schlechter Prognose untersucht. Neben einer verzögerten Progression waren in der Temsirolimus-Gruppe auch weniger schwere Nebenwirkungen zu verzeichnen. (Hudes et al. 2007)

Everolimus führte zu einem längeren progressionsfreien Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe bei Patienten mit Therapieversagen unter VEGF-Therapie. (Motzer et al. 2008) Eine Übersicht der aktuellen Empfehlungen zur systemischen Therapie beim fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom ist in der folgenden Tabelle 5 aufgelistet.

Tab. 5: Evidenzbasierter Behandlungsalgorithmus (Grad A) für die systemische Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms; Empfehlungen der European Association of Urology (EAU) von 2010 (Ljungberg 2012)

Behandlung	Risiko oder vorangegangene Behandlung	Empfohlene Substanz
First line	niedriges bis mittleres Risiko	Sunitinib Bevacizumab plus Interferon α Pazopanib
	hohes Risiko	Temsirolimus
Second line	Nach Zytokintherapie	Sorafenib Pazopanib
	Nach VEGFR-Therapie	Everolimus
	Nach mTOR-Inhibitor-Therapie	klinische Studien (Grad C)

1.6.2.3. Chirurgische und radiologische Therapie

Patienten mit lokal fortgeschrittenem, nicht metastasiertem Nierenzellkarzinom profitieren von einer Nephrektomie. (Zini et al. 2008) Beim metastasierten Nierenzellkarzinom kann eine Tumornephrektomie aus palliativer Indikation vorgenommen werden. Die operative Resektion solitärer Metastasen zeigte keinen Einfluss auf die Prognose, bei kompletter Entfernung aller Metastasen wurde jedoch ein Überlebensvorteil beobachtet. (van der Poel et al. 1999) Symptomatische, nicht resektable Gehirn- und Knochenmetastasen können palliativ bestrahlt werden. (Ljungberg et al. 2010)

1.7. Prognose

Die aktuelle 5-Jahres-Überlebensrate für Nierentumoren liegt in Deutschland zwischen 65 und 75 %. In den 1980er Jahren betrug sie nur etwa 50 %. (RKI und GEKID 2012) Eine Vielzahl von Faktoren wurde auf ihre Aussagekraft für die Prognose des Nierenzellkarzinoms untersucht. Dazu zählen anatomische, histologische und klinische Charakteristika sowie molekulare Marker.

Laut Angaben des National Cancer Institute der Vereinigten Staaten beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate für lokal begrenzte Tumoren 90,3 %, für lokal fortgeschrittene - (mit

regionalen Lymphknotenmetastasen) 62,7 % und für Tumoren mit Fernmetastasen 10,6 %. (<http://www.seer.cancer.gov>) Bei 25 bis 30 % der Patienten hat der Tumor bereits zum Diagnosezeitpunkt metastasiert, weitere 30 % entwickeln im Verlauf der Erkrankung Metastasen. (Ljungberg 2007) Die am meisten etablierte Einteilung nach anatomischen Gesichtspunkten ist die TNM-Klassifikation der UICC, die in den vergangenen Jahren mehrfach revidiert wurde (siehe Kapitel 1.1.3.3.). Prognostisch besonders ungünstig ist neben dem Vorhandensein von Fernmetastasen eine Invasion der renalen Fettkapsel, der Vena cava und der Nebenniere. Unter den histologischen Charakteristika gilt das Fuhrman-Grading als unabhängiger Prognosefaktor. Auch zwischen den einzelnen histologischen Typen sind Unterschiede festzustellen, so hat das klarzellige Nierenzellkarzinom eine schlechtere Prognose als die anderen histologischen Varianten. Sarkomatoide Anteile gelten bei allen Subtypen als prognostisch ungünstig. Tumornekrosen, mikrovaskuläre Invasion und eine Beteiligung des Sammelrohrsystems sind mit einem schlechten Outcome assoziiert. Klinische Merkmale wie Kachexie und Thrombozytose geben ebenfalls Hinweise auf eine ungünstige Prognose. Auch der Karnowsky-Index und der Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status (ECOG PS) erlauben Aussagen über das Outcome. (Lam et al. 2006)

Es wurden verschiedene Prognosemodelle entwickelt, deren Ziel es ist, durch Kombination mehrerer Faktoren eine erhöhte Genauigkeit der Risikobeurteilung zu erreichen. Stellvertretend sollen hier der Motzer-Score und das Staging-System der University of California Los Angeles genannt werden. Der Motzer-Score unterteilt die Patienten unter Verwendung von fünf Faktoren (Karnowsky-Index, Lactatdehydrogenase, Hämoglobin, Serumkalzium, Zeit zwischen Diagnose und Therapiebeginn) in drei Risikogruppen. Er wird häufig in klinischen Studien, vor allem in solchen zu den molekularen Therapien, eingesetzt. (Motzer et al. 2004) Die University of California Los Angeles entwickelte ein integriertes Stagingssystem (UISS) aus TNM-Klassifikation, Fuhrman-Grading und ECOG PS, welches die Patienten in fünf Gruppen mit signifikanten Unterschieden im krankheitsspezifischen Überleben einteilt. (Zisman et al. 2001) Die Validierung dieser Systeme zeigt eine höhere Genauigkeit als die herkömmlich verwendeten Stagingssysteme wie die TNM-Klassifikation oder das Grading allein. (Lane und Kattan 2005)

Auch molekulare Marker in Tumorgewebe und Serum werden auf ihre prognostische Aussagekraft untersucht. Dazu zählen zum einen generelle onkologische Marker wie p53 und Ki67, zum anderen Marker aus für das Nierenzellkarzinom spezifischen Signalwegen. Eine vermehrte Expression des an der Zellproliferation beteiligten Nukleusantigens Ki67 ist mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, einer geringen histologischen Differenzierung und einem verkürzten Gesamtüberleben verbunden. Allerdings ist die Analyse aufwendig und für die Routineanwendung unpraktisch. Eine erhöhte Expression des Tumorsuppressorgens p53 ist ebenfalls mit einer ungünstigen Prognose assoziiert, es handelt sich dabei aber um ein seltenes Ereignis beim klarzelligen Nierenzellkarzinom. (Nogueira und Kim 2008) Zur Identifikation spezifischer Marker für das Nierenzellkarzinom sind vor allem die Angiogenesesignalwege von Bedeutung. Über die prognostische Aussage einer Überexpression von HIF1 α gibt es widersprüchliche Ergebnisse. Die von HIF regulierte Carboanhydrase 9 (CA9) wird im renalen Normalgewebe nicht exprimiert, aber bei 95% der klarzelligen Nierenzellkarzinome. Eine erhöhte Expression ist mit einer verbesserten Prognose assoziiert. Außerdem kann anhand von CA9 die Wirksamkeit einer Therapie mit Interleukin 2 vorhergesagt werden: Patienten mit einem hohen Expressionslevel zeigen ein besseres Ansprechen. CA9 kann auch als Serummarker dienen. Patienten, bei denen CA9 im peripheren Blut nachgewiesen wird, haben ein verkürztes 5-Jahres-Überleben. Tumoren mit einer erhöhten Produktion von VEGF zeigen einen aggressiveren Phänotyp. Auf dem mTOR-Signalweg ist die Deletion der Phosphatase PTEN mit einer ungünstigen Prognose verbunden. Eine Überexpression des phosphorylierten ribosomalen S6 Proteins (pS6) korreliert positiv mit dem Ansprechen auf Temsirolimus. Bisher wird keiner dieser Marker in der klinischen Routinediagnostik eingesetzt. Ziel ist es, durch Einsatz molekularer Marker in multivariaten Prognosemodellen deren Aussagekraft zu erhöhen. (Ljungberg 2007, Eichelberg et al. 2009)

2. Fragestellung

Die individuelle Vorhersage des Krankheitsverlaufs beim Nierenzellkarzinom ist in der klinischen Praxis bisher nur unzureichend möglich. Die Identifikation molekularer Marker als Prognosefaktoren ist daher ein wichtiger Forschungsansatz. Zum einen steigt die Zahl inzidentell entdeckter Tumoren im Frühstadium, bei denen eine Risikoabschätzung die Therapieplanung erleichtern kann. Andererseits ist bei fortgeschrittenen Befunden die Vorhersagbarkeit des Ansprechens insbesondere auf molekulare Therapien von Bedeutung.

Genetische Veränderungen spielen in der Tumorgenese und Krankheitsprogression eine entscheidende Rolle und könnten als molekulare Marker genutzt werden. In vorangegangenen Studien des Forschungslabors der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Jena (UKJ) wurden mittels Array-CGH mehrere spezifische genetische Veränderungen beim klarzelligen Nierenzellkarzinom identifiziert, die mit dem klinischen Verlauf, insbesondere mit der Metastasierung, korrelierten.

Eine der relevanten chromosomalen Aberrationen, die eine signifikante Korrelation mit Metastasierung und tumorspezifischem Überleben zeigten, war der Zugewinn der Region 20q11.21q13.32. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es nun, die prognostische Relevanz von Zugewinnen der Region 20q12 unter Anwendung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) an Gewebeproben primärer klarzelliger Nierenzellkarzinome zu bewerten. Daraus ergeben sich folgende Aufgabenstellungen:

1. Berechnen eines Cut-Off-Wertes anhand von Auswertungsdaten aus Normalgeweben zur Validierung der Sondensignale
2. Analyse der Ergebnisse der FISH-Untersuchung der Tumorgewebe unter Berücksichtigung der klinischen und histopathologischen Daten:
 - Ermitteln eines Schwellenwertes zur Dichotomisierung der Variable Zugewinn
 - Prüfen der Korrelation zwischen einem Zugewinn von 20q12 und der Metastasierung, der T-Kategorie, dem Grading und dem krankheitsspezifischen Überleben

- Analyse des Überlebens der Patienten mit und ohne Zugewinn im Tumorgewebe
- Analyse des progressionsfreien Überlebens der Patienten mit und ohne Zugewinn im Tumorgewebe

Die unter 2. aufgeführten Aufgabenstellungen werden jeweils für das gesamte Patientenkollektiv sowie für die Gruppe der Patienten mit organbegrenztem Tumor (bis einschließlich T2) bearbeitet.

3. Vergleich der Ergebnisse der FISH-Untersuchung mit den Daten der vorausgegangenen Array-CGH

3. Material und Methoden

3.1. Patientenkollektiv und Material

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten 58 Tumorgewebeproben von Patienten mit primärem klarzelligem Nierenzellkarzinom wurden im Rahmen einer radikalen oder partiellen Tumornephrektomie in der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Jena im Zeitraum von 1994 bis 2004 entnommen. Jeweils 29 (50,0 %) der insgesamt 58 untersuchten Tumoren waren metastasiert (M1) bzw. nicht metastasiert (M0). Auch wurden zehn Normalgewebe aus tumorfreien Anteilen der Nephrektomiepräparate untersucht. Die Proben wurden in der klinikinternen Tumorgewebekbank als Gefrierblöcke in flüssigem Stickstoff (-196 °C) asserviert. Bei allen Patienten lag eine schriftliche Einverständniserklärung vor.

Die Patienten waren in der Mehrzahl Männer (60 %). Die Altersverteilung reichte von 39 bis 78 Jahre. Das Durchschnittsalter betrug 61 Jahre (Median: 62 Jahre). Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 58 Monate (0 bis 157 Monate; Median: 47 Monate). Für die nicht metastasierten Tumoren lag die mittlere Nachbeobachtungszeit bei 82 Monaten (9 bis 157 Monate; Median: 76 Monate).

3.2. Methoden

3.2.1. Vergleichende genomische Hybridisierung (comparative genomic hybridization, CGH)

Die Auswahl der in dieser Arbeit mit FISH untersuchten Region basiert auf Array-CGH-Untersuchungen des Forschungslabors der Klinik für Urologie des UKJ. Da die Resultate zum Vergleich in Ergebnisteil und Diskussion mit einbezogen werden, soll an dieser Stelle eine kurze Erläuterung der Methode folgen.

Bei der CGH werden Tumor-DNA und Kontroll-DNA mit normalem Karyotyp isoliert, unterschiedlich fluoreszenzmarkiert und zu gleichen Teilen gemischt auf eine Referenz-DNA hybridisiert. Sind Patienten- und Kontrollgenom identisch, ist die Signalintensität der beiden Fluoreszenzfarbstoffe gleich. Eine Differenz der Signalstärke zeigt Zugewinne oder Verluste im Tumorgenom an. Die Standardvariante der CGH ist durch Verwendung der gesamten genomischen DNA und deren Hybridisierung auf Metaphasechromosomen gekennzeichnet.

Bei der für die oben erwähnten Untersuchungen angewendeten Array-CGH hingegen erfolgt die Hybridisierung auf einem Mikrochip, der mit zahlreichen einzelnen DNA-Fragmenten (Klonen) als Referenz beladen ist. So wird eine höhere Auflösung als bei der Standard-CGH erreicht und die Analyse vieler Regionen, die von Interesse sind, in einem einzigen Test ermöglicht.

Analysiert wurden 56 primäre klarzellige Nierenzellkarzinome, davon waren 32 metastasiert und 24 nicht metastasiert. Die Extraktion der DNA aus dem Tumorgewebe erfolgte mit einem kommerziellen Kit (QIAamp® DNA Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden) entsprechend den Anwendungshinweisen des Herstellers. Für die Hybridisierung wurden DNA-Chips mit 2799 BAC- und PAC-Klonen verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Analyseprogrammes aCGHPipeline. (Kreuz et al. 2007) Die log₂-ratios wurden durch Anwendung der circular binary segmentation (Olshen et al. 2004) eingeteilt. Zur Klassifizierung in Zugewinne, Verluste und normalen Karyotyp wurde als Schwellenwert die 1,5-fache Standardabweichung festgelegt.

Es wurden mehrere chromosomale Aberrationen identifiziert, die in mehr als 15 % der untersuchten Tumoren vorhanden waren und signifikant mit der Metastasierung und dem krankheitsspezifischen Überleben assoziiert waren. Eine dieser Aberrationen war der Zugewinn der Region 20q11.21q13.32. Dieses Ergebnis soll in der vorliegenden Arbeit unter Anwendung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung validiert werden. Dazu wurden größtenteils dieselben Tumorgewebe verwendet wie bei der Array-CGH-Untersuchung.

3.2.2. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

3.2.2.1. Grundlagen der FISH

Die FISH ist eine Methode der molekularen Zytogenetik, mit der sich ganze Chromosomen, Chromosomenabschnitte, einzelne Regionen oder Gene darstellen lassen. Grundprinzip ist dabei das Binden von DNA-Sonden an den komplementären DNA-Strang (Hybridisierung). Sowohl Sonde als auch Ziel-DNA müssen dazu denaturiert werden. Ein Vorteil der FISH besteht darin, dass sie auch an nicht kultivierbaren Zellen an Interphasekernen - wie in der vorliegenden Studie - angewendet werden kann. Kommerzielle Sonden, wie sie hier verwendet wurden, sind direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Im Fluoreszenzmikroskop werden die Sonden unter Verwendung entsprechender Filter durch

Licht einer definierten Wellenlänge angeregt. Infolge dessen erzeugt der Fluoreszenzfarbstoff ein Licht bestimmter Wellenlänge. Dieses emittierte Licht wird wiederum mit Hilfe eines Filters definierter Wellenlänge erfasst, sodass die Signale sichtbar werden.

3.2.2.2. Untersuchungs sonden

Es gibt eine Vielzahl verschiedener Sondenarten. Zentromersonden beruhen auf der Bindung an repetitive Sequenzen (Satelliten-DNA) im Zentromerbereich eines Chromosoms. Sie eignen sich besonders zur Identifikation numerischer Chromosomenaberrationen. Regionenspezifische Sonden binden gezielt an eine bestimmte Sequenz, die nur einmal auf einem Chromosom vorhanden ist, und finden Anwendung bei der Suche nach strukturellen Aberrationen wie Deletionen, Duplikationen oder Amplifikationen.

In dieser Studie wurden kommerzielle FISH-Sonden der Firma Kreatech™ verwendet: ein Kombinationspräparat von zwei regionenspezifischen Sonden (ON MDS 20q- (PTPRT 20q12) / 20q11), die an Loki auf Chromosom 20 binden (dabei dient die Sonde für 20q11 als Kontrolle, ob ein isolierter Zugewinn der Region 20q12 vorliegt oder der gesamte Chromosomenarm bzw. das gesamte Chromosom betroffen ist), sowie eine Zentromersonde für Chromosom 2 als Polyploidiekontrolle. Eine Übersicht findet sich in Tabelle 6. Abbildung 2 zeigt Falschfarbenbilder von Zellkernen als Beispiele für FISH-Befunde mit diesen Sonden.

Tab. 6: verwendete Sonden (Poseidon™ DNA Probes, Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Niederlande)

Sonde	Fluoreszenzmarkierung	Farbe	Exzitation/Emission [Wellenlänge in nm]
20q-(PTPRT 20q12)	PlatinumBright550	rot	550/850
20q11	PlatinumBright495	grün	495/517
SE 2 (D2 Z)	PlatimunBright415	blau	429/470

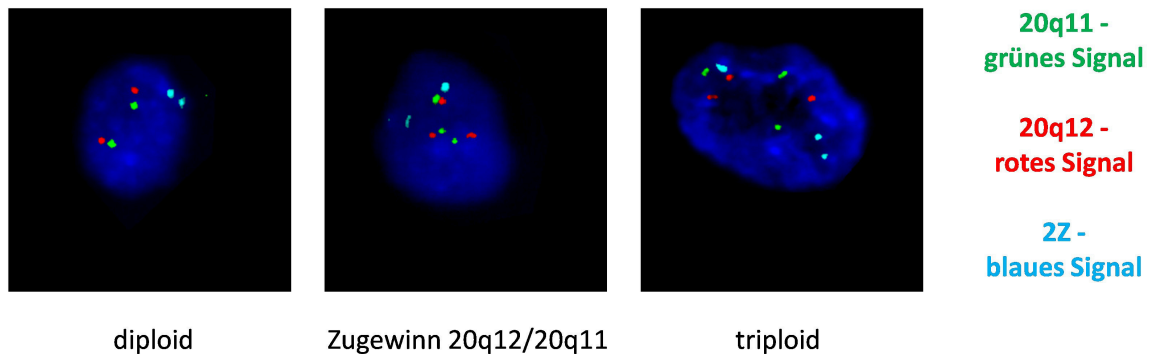


Abb. 2: Falschfarbenbilder von FISH-Befunden eines unauffälligen Zellkerns und zweier Zellkerne mit Zugewinnen - einem Zugewinn von 20q12 und 20q11 und einem triploiden Kern mit Zugewinn auch von Chromosom 2

3.2.2.3. Durchführung der FISH

Tab. 7: Für die FISH verwendete Chemikalien und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
PT-100-Puffer	0,1 M Citrat, 0,05 % Tween (2,104 g Zitronensäure / 100 ml Aqua dest. + 50 µl Tween)
Fixativ	Methanol : Eisessig = 3 : 1
Pepsinlösung	500 µl Pepsinstammlösung (5 g Pepsin in 50 ml sterilem Aqua dest., bei -20 °C aufbewahrt), 99 ml Aqua dest., 1 ml 1 N HCl
1x PBS-Puffer	Pufferlösung: Natriumchlorid, Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat
1 % Formaldehyd	1,25 ml MgCl, 1,35 ml 37 % Formaldehyd, 47,40 ml 1x PBS
0,4x SSC/Igepal	10 ml 20x SSC (Standard Saline Citrat), 1,5 ml Igepal, 500 ml Aqua dest.
2x SSC/Igepal	50 ml 20x SSC, 250 µl Igepal, 500 ml Aqua dest.
DAPI	4,6 Diamino-2-Phenylindol, Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung von DNA

3.2.2.3.1. Zellkernpräparation

Zur Präparation der Kerne aus dem Gewebe werden zunächst 10 Gefrierschnitte einer Schnittdicke von 50 µm angefertigt. Mit einer Lanzette wird das Gewebe mechanisch zerkleinert. Es wird ca. 100 µl PT-100 Puffer dazu gegeben. Zur besseren Separation der Zellen wird die Suspension mittels einer Pipette gemischt. Anschließend erfolgen die Aufnahme in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß und eine 90minütige Inkubation bei

Raumtemperatur, welche zur Desaggregation des Gewebes in einzelne Zellen führt. Danach werden die Zellen mit frisch hergestelltem Fixativ gewaschen. Dazu wird die Suspension 2 Minuten bei 6000 U/min zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, nach Vermischen des Sediments mit 500 µl Fixativ erneut zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Dieser Schritt wird ein Mal wiederholt und das Sediment am Ende nochmals mit 500 µl Fixativ vermischt. Nach dem Auftropfen von 20 µl der Suspension auf einen Objektträger folgt die lichtmikroskopische Beurteilung bei 100facher Vergrößerung. Dabei wird ein Bereich mit optimaler Kerndichte für die Hybridisierung mit dem Diamantstift auf der Unterseite des Objektträgers markiert. Die Objektträger werden anschließend in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 85 %, 100 % Ethanol, Raumtemperatur, je 2 Minuten) dehydriert, um dann entweder in 100 % Ethanol bei -20 °C gelagert oder gleich im Anschluss der Hybridisierung zugeführt zu werden.

3.2.2.3.2. Hybridisierung

Um optimale Hybridisierungsbedingungen zu ermöglichen, ist eine enzymatische Vorbehandlung der Zellkerne erforderlich. Hierzu werden die Objektträger in einer im Wasserbad vorgewärmten Pepsinlösung 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgt ein 3minütiges Waschen in 1x PBS-Puffer, die Inkubation in 1 % Formaldehyd für 10 Minuten und erneut ein 3minütiger Waschschrift in 1x PBS. Letztere Vorgänge finden bei Raumtemperatur statt. Schließlich wird durch die Alkoholreihe (50 %, 70 %, 100 %, je 2 Minuten) dehydriert.

Nun erfolgt die Zugabe der FISH-Sonden. 10,2 µl der Sonden 20q12/20q11 werden in einem Reaktionsgefäß mit 1,8 µl der Sonde SE 2 gemischt. Das so erhaltene Volumen von 12 µl reicht für 4 Hybridisierungen aus. Der Sondenmix wird 10 Minuten lang bei 90 °C im Wasserbad denaturiert. Danach werden 3 µl pro Objektträger auf die zuvor ausgewählte Stelle mit optimaler Zellkerndichte aufgetragen, diese mit einem runden Deckglas abgedeckt und mit Montagekleber (Fixogum®, Marabu GmbH & Co. KG, Tamm, Deutschland) verschlossen. Abschließend werden die Objektträger 5 Minuten auf der Wärmplatte (80 °C) denaturiert und dann etwa 48 Stunden in einer feuchten Kammer bei 37 °C im Brutschrank hybridisiert.

3.2.2.3.3. Waschschritte

Nach der Hybridisierung werden Kleber und Deckglas entfernt, die Objektträger je 2 Minuten im Wasserbad bei 72 °C in 0,4x SSC/Igepal und bei Raumtemperatur in 2x SSC/Igepal gewaschen und durch die Alkoholreihe (50 %, 85 %, 100 %, je 1 Minute) dehydriert. Auf die hybridisierten Stellen werden nun 20 µl DAPI aufgetragen und mit einem Deckglas (60x22 mm) bedeckt. Bis zur Auswertung werden die Objektträger lichtgeschützt im Kühlschrank (-4 °C) aufbewahrt.

3.2.2.4. Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung erfolgt am Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Carl Zeiss AG, Deutschland) mit einer Anregungslichtquelle (HXP 120 Kübler Codix) und Sonden- und DAPI-spezifischen Filtern. Die Bilder werden mit Hilfe einer CCD-Kamera (IMAC CCD S30, Compulog Systems GmbH, Böblingen, Deutschland) und eines Bildanalyseprogrammes (ISIS®, Metasystems, Altlußheim, Deutschland) aufgenommen und archiviert.

Bei 1000facher Vergrößerung werden die Fluoreszenzsignale für 20q11, 20q12 und Chromosom 2 in jeweils 100 Zellkernen pro Objektträger gezählt. Dabei werden Tumorzellen ausgesucht, die sich morphologisch von Normalzellen durch größere Kerne, unregelmäßige Umrisse und ungleichmäßige DAPI-Färbung unterscheiden.

3.2.2.5. Statistische Auswertung und Cut Off Berechnung

Die Datenerfassung und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Microsoft Excel (Version 1997-2003; 2007 im Kompatibilitätsmodus).

Zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse wurde nach Auszählung der Signale in zehn Normalgeweben nach folgender Formel ein Cut-Off-Wert berechnet:

Cut Off = (Mittelwert der unauffälligen Zellen) – 2 x Standardabweichung.

Für die Auswertung wurde das Statistikprogramm SPSS (Version 19.0) verwendet. Mit Hilfe von ROC-Kurven wurde ein optimaler Schwellenwert für die Bewertung der Amplifikationen als testpositiv oder testnegativ ermittelt. ROC-Kurven sind Funktionen, die durch die Abtragung von Sensitivität gegen 1 – Spezifität entstehen. Sie können zum Vergleich von Schwellenwerten für medizinische Tests genutzt werden, da die Funktion mit der größten

„Fläche unter der Kurve“ den Wert anzeigt, bei dem die Summe aus Sensitivität und Spezifität maximal ist. Die Beurteilung der Korrelation zwischen Aberrationen und Metastasierung, Überleben und Tumoreigenschaften erfolgte mit dem exakten Test nach Fisher bzw. mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson. Krankheitsspezifische Überlebensfunktionen wurden durch Anwendung der Kaplan-Meier-Methode bestimmt. Das Risiko wurde mit dem Odds Ratio abgeschätzt. Weiterhin wurde das Hazard-Ratio durch Cox-Regression ermittelt. Als signifikant galt ein p-Wert von $<0,05$.

Sensitivität und Spezifität wurden mit den allgemein angewandten Formeln

Sensitivität = (richtig positiv) / (richtig positiv + falsch negativ) und

Spezifität = (richtig negativ) / (richtig negativ + falsch positiv)

berechnet.

4. Ergebnisse

Klarzellige Nierenzellkarzinome von 58 Patienten wurden mit Interphase-FISH auf Aberrationen der chromosomalen Region 20q12 untersucht. Bei den beobachteten Veränderungen handelte es sich fast ausschließlich um Zugewinne.

Die Auswertung der genomischen Veränderungen erfolgte für jeden einzelnen Zellkern separat. Als „Zugewinn“ wurde gewertet, wenn die regionenspezifische Sonde mindestens ein Signal mehr aufwies als die Zentromersonde für Chromosom 2 (2Z), die als Polyploidiekontrolle diente. Der Anteil der polyploiden Kerne pro ausgewertetem Tumorgewebe lag zwischen 0 und 80 %.

Isolierte Zugewinne der Region 20q12 traten bei keinem Tumor auf. Bei einem Zugewinn von 20q12 fand sich auch immer Zugewinne der Kontrollregion 20q11. In der folgenden Auswertung wurde der Schwerpunkt auf die Region 20q12 gelegt, da diese der auch in der Array-CGH veränderten rekurrenten Region entspricht.

Die Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung der FISH-Signale für die Regionen 20q12, 20q11 und 2Z sind gemeinsam mit den Patientendaten in Tabelle 8 aufgelistet.

Tab. 8 (Seite 35-36): Patientendaten und Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung

Patientendaten										Auswertung			
Patient	Geschlecht	Alter	G	T	N	M	Metastasierungszeit [Monate]	verstorben	tumorbedingt verstorben	Nachbeobachtung [Monate]	Zugewinn 20q12 [%]	Zugewinn 20q11 [%]	Zugewinn 22 [%]
1	männlich	66	1	3b	0	0	-	nein	nein	156	6	5	1
2	weiblich	55	1	2	0	0	-	nein	nein	147	5	5	2
3	weiblich	61	2	1b	0	0	-	nein	nein	123	19	11	10
4	männlich	69	2	1a	0	0	-	nein	nein	66	18	34	1
5	weiblich	71	2	1b	0	0	-	nein	nein	47	3	3	0
6	männlich	69	1	1b	0	0	-	nein	nein	149	7	8	5
7	weiblich	63	1	1a	0	0	-	nein	nein	76	11	6	4
8	männlich	55	2	1a	0	0	-	nein	nein	120	19	18	2
9	weiblich	57	2	1b	0	0	-	nein	nein	157	10	11	0
10	weiblich	61	2	1b	0	0	-	nein	nein	60	32	32	8
11	männlich	57	1	1a	0	0	-	nein	nein	37	4	2	2
12	weiblich	78	2	1a	0	0	-	nein	nein	116	8	10	0
13	männlich	54	1	1b	0	0	-	nein	nein	142	7	5	1
14	weiblich	70	2	1b	0	0	-	ja	nein	98	5	8	4
15	männlich	58	2	3a	0	0	-	nein	nein	35	13	14	2
16	männlich	53	1	3a	0	0	-	nein	nein	38	11	6	0
17	männlich	52	2	1b	0	0	-	nein	nein	56	10	6	1
18	weiblich	71	2	1b	0	0	-	ja	nein	17	3	8	3
19	männlich	63	2	2	0	0	-	ja	nein	112	19	16	25
20	weiblich	62	1	1a	0	0	-	nein	nein	9	9	8	6
21	männlich	51	2	1b	0	1	40	ja	ja	51	8	7	1
22	weiblich	53	2	1b	0	1	35	nein	nein	82	16	9	0
23	männlich	57	2	3a	1	1	9	ja	ja	16	52	35	31
24	weiblich	50	1	2	0	0	-	nein	nein	122	9	16	23
25	weiblich	62	2	3a	0	1	61	ja	ja	77	60	49	30
26	männlich	55	2	1b	0	1	0	ja	ja	24	81	66	0
27	männlich	73	1	1a	0	0	-	nein	nein	125	13	16	3
28	männlich	65	2	2	0	0	-	ja	nein	33	12	9	11
29	weiblich	70	2	2	0	1	0	nein	nein	120	7	5	0
30	männlich	51	2	2	0	0	-	nein	nein	49	52	48	9
31	männlich	63	3	3a	0	1	25	ja	ja	63	49	50	1
32	männlich	63	3	2	0	1	22	nein	nein	22	17	13	3
33	männlich	69	2	2	0	1	0	nein	nein	8	53	47	24
34	männlich	57	3	3b	0	1	0	nein	nein	94	10	6	0
35	weiblich	66	1	3b	0	1	0	ja	ja	41	17	16	2
36	weiblich	68	2	2	0	1	0	ja	ja	5	19	13	80
37	männlich	68	1	1b	0	0	-	ja	ja	29	79	74	7
38	weiblich	56	2	2	1	1	0	nein	nein	81	13	2	3
39	weiblich	51	2	2	1	1	0	nein	nein	3	67	55	9
40	männlich	48	2	1b	0	0	-	nein	nein	96	9	3	3

Patientendaten										Auswertung			
Patient	Geschlecht	Alter	G	T	N	M	Metastasierungszeit [Monate]	verstorben	tumorbedingt verstorben	Nachbeobachtung [Monate]	Zugewinn 20q12 [%]	Zugewinn 20q11 [%]	Zugewinn 22 [%]
41	weiblich	64	2	1b	0	1	3	nein	nein	7	12	14	5
42	männlich	71	2	1b	0	1	16	ja	ja	52	9	4	6
43	männlich	56	2	2	0	1	0	nein	nein	6	47	25	29
44	männlich	56	2	1b	0	1	0	nein	nein	6	24	19	33
45	männlich	62	2	1a	0	0	-	nein	nein	86	13	5	1
46	männlich	64	k.A.	1b	0	0	-	nein	nein	24	11	9	2
47	männlich	70	2	3b	1	1	38	nein	nein	38	73	60	0
48	männlich	59	2	3b	0	1	0	ja	ja	14	58	52	38
48	weiblich	39	2	2	1	1	0	ja	ja	21	34	27	61
50	männlich	51	2	2	0	1	8	ja	ja	23	31	27	0
51	männlich	62	3	3b	0	1	0	ja	ja	18	12	16	0
52	männlich	64	2	2	0	1	0	nein	nein	48	66	62	25
53	weiblich	72	2	2	0	1	0	ja	ja	3	13	9	0
54	männlich	44	2	1b	0	0	-	nein	nein	48	12	5	6
55	männlich	76	2	1b	0	1	0	nein	nein	19	10	11	0
56	männlich	74	2	3a	0	1	0	nein	nein	0	57	46	66
57	weiblich	54	3	3b	1	1	0	nein	nein	6	15	16	2
58	weiblich	77	2	2	0	1	24	nein	nein	24	88	83	52

4.1. Tumorklassifikation und Häufigkeiten

Die Tumoren wurden entsprechend der TNM-Klassifikation der UICC von 2002 eingeteilt. In Tabelle 9 ist die Häufigkeitsverteilung der klinischen und histopathologischen Patientendaten dargestellt.

Tab. 9: Klinische und histopathologische Daten der 58 Patienten (Einteilung entsprechend UICC-Klassifikation von 2002)

Variable	Anzahl in % (absolut)
Metastasierung	
M0	50,0 (29)
M1	50,0 (29)
T-Kategorie	
T1a	13,8 (8)
T1b	34,5 (20)
T2	29,3 (17)
T3a	10,3 (6)
T3b	12,1 (7)
T3c	-
T4	-
Grading	
G1	20,7 (12)
G2	69,0 (40)
G3	8,6 (5)
Angabe fehlt	1,7 (1)

4.2. Bestimmen eines Schwellenwertes

4.2.1. Berechnung des Cut-Off-Wertes mit Daten aus den Normalgeweben

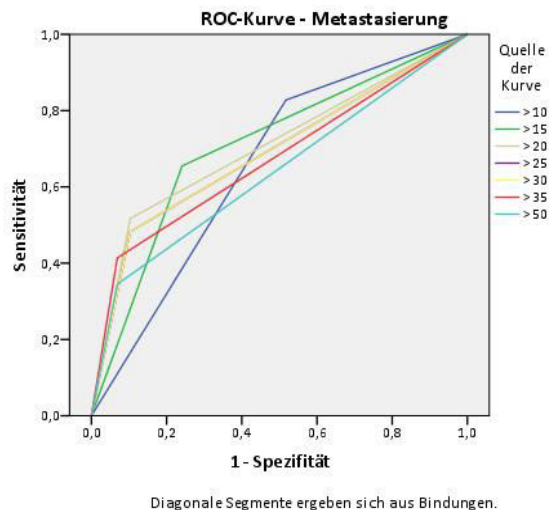
Aus den Mittelwerten der Anzahl von Kernen ohne Veränderung von 20q12 aus zehn Normalgeweben wurde für jede Sonde ein Cut-Off-Wert errechnet (Mittelwert minus doppelte Standardabweichung). Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tab. 10: Mittelwerte, Standardabweichungen und daraus berechnete Cut-Off-Werte für die Anzahl unauffälliger Zellkerne in den Normalgeweben

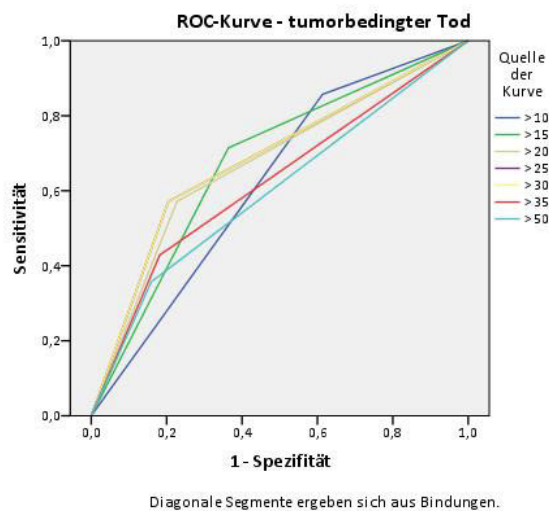
Signal	20q11	20q12	22
Mittelwert	94	89	93
Standardabweichung	1,99	4,80	2,90
Cut Off	90	80	87

4.2.2. Ermitteln eines Schwellenwertes anhand von ROC-Kurven

Um die Variable Zugewinn von 20q12 zu dichotomisieren, wurde durch die Analyse von ROC-Kurven ein optimaler Schwellenwert für diesen Zugewinn in Bezug auf Metastasierung und tumorbedingten Tod ermittelt. Dazu wurden, wie in Abbildung 3 dargestellt, ROC-Kurven bei unterschiedlichen Schwellenwerten von 10-50 % (in 5 % - Stufen) für Zugewinne im Tumorgewebe erstellt und miteinander verglichen.



Fläche unter der Kurve	
Variable(n) für Testergebnis	Fläche
zugew10	,655
zugew15	,707
zugew20	,707
zugew25	,690
zugew30	,690
zugew35	,672
zugew50	,638



Fläche unter der Kurve	
Variable(n) für Testergebnis	Fläche
zugew10	,622
zugew15	,675
zugew20	,672
zugew25	,683
zugew30	,683
zugew35	,623
zugew50	,599

Abb. 3: ROC-Kurven zum Vergleich von Schwellenwerten jeweils für die Ereignisse Metastasierung und tumorbedingter Tod

Ein optimaler Schwellenwert lag für die Metastasierung bei 15 % bzw. 20 %, für den tumorbedingten Tod bei 25 % bzw. 30 % Zugewinnen. Um einen Wert zu finden, der möglichst viele Zugewinne berücksichtigt, wurde 20 % als Schwellenwert festgelegt. Zudem war auch bei der Cut-Off-Ermittlung im Normalgewebe 20 % die Schwelle zwischen normal

und verändert. Für diesen Wert beträgt die Sensitivität 52 % (Metastasierung) bzw. 57 % (tumorbedingter Tod) und die Spezifität 90 % (Metastasierung) bzw. 77 % (tumorbedingter Tod). In der weiteren Auswertung wurden Zugewinne von 20q12 in mehr als 20 % der Zellen eines Tumors somit als prognostisch relevant gewertet und die untersuchten Tumoren dementsprechend eingeteilt.

4.3. Relevanz eines Zugewinns von 20q12 für Metastasierung (M), T-Kategorie (T), Grading (G) und Überleben

4.3.1. Häufigkeit von Zugewinnen

18 (31,0 %) der insgesamt 58 untersuchten Tumoren wiesen einen Zugewinn von 20q12 auf. Die Auswertung der Verteilung von Tumoren mit und ohne Zugewinn hinsichtlich bestimmter klinischer und histopathologischer Merkmale ist in Tabelle 11 aufgelistet und in Abbildung 4 graphisch dargestellt. Deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen fanden sich vor allem bei den Parametern Metastasierung und tumorbedingter Tod.

4. Ergebnisse

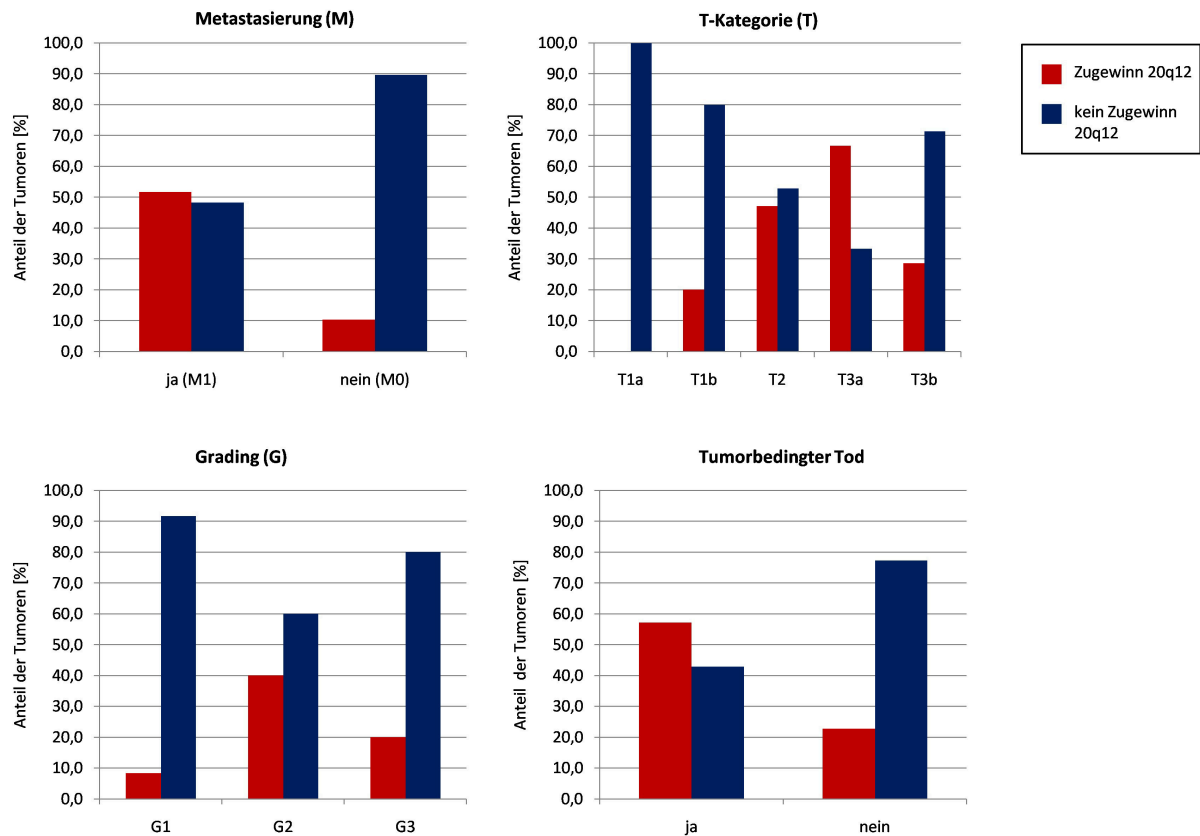


Abb. 4: Graphische Darstellung der Häufigkeit von Zugewinnen von 20q12 in Bezug auf verschiedene klinische und histopathologische Merkmale

Tab. 11: prozentuale Verteilung der Zugewinne von 20q12 in Bezug auf verschiedene klinische und histopathologische Merkmale (absolute Häufigkeit in Klammern)

	Metastasierung (M)		T-Kategorie (T)				
	ja (M1)	nein (M0)	T1a	T1b	T2	T3a	T3b
Zugewinn 20q12	51,7 % (15)	10,3 % (3)	0,0 % (0)	20,0 % (4)	47,1 % (8)	66,7 % (4)	28,6 % (2)
kein Zugewinn 20q12	48,3 % (14)	89,7 % (26)	100,0 % (8)	80,0 % (16)	52,9 % (9)	33,3 % (2)	71,4 % (5)

	Grading (G)			tumorbedingter Tod	
	G1	G2	G3	ja	nein
Zugewinn 20q12	8,3 % (1)	40,0 % (16)	20,0 % (1)	57,1 % (8)	22,7 % (10)
kein Zugewinn 20q12	91,7 % (11)	60,0 % (24)	80,0 % (4)	42,9 % (6)	77,3 % (34)

4.3.2. Korrelationsanalysen

4.3.2.1. Korrelation zur Metastasierung (M)

Es konnte eine höchst signifikante Korrelation zwischen einem Zugewinn der Region 20q12 und der Metastasierung gezeigt werden (Exakter Test nach Fisher, $p=0,001$). Nach den Phi-

Koeffizienten ($\phi=0,447$) kann diese als mittlere Korrelation bewertet werden. Auch die Risikoanalyse unterstützt die Hypothese, dass es sich bei einem Zugewinn von 20q12 um einen Risikofaktor für die Metastasierung handelt (OR=9,3; 95 % CI [2,3; 37,6]).

4.3.2.2. Korrelation zu T-Kategorie (T) und Grading (G)

Eine signifikante Korrelation ergab sich ebenfalls für den Zusammenhang zwischen Zugewinn und T-Kategorie (Chi-Quadrat nach Pearson, $p=0,035$). Hier ist ebenfalls von einer mittleren Korrelation auszugehen ($\phi=0,423$).

Für das Grading konnte keine signifikante Korrelation zu einem Zugewinn von 20q12 nachgewiesen werden (Chi-Quadrat nach Pearson, $p=0,099$).

4.3.2.3. Korrelation zum tumorbedingten Tod

Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen dem Zugewinn von 20q12 und dem tumorbedingten Tod (Exakter Test nach Fisher, $p=0,022$). Diese kann als mittlere Korrelation bewertet werden ($\phi=0,318$). Patienten, die einen Zugewinn von 20q12 im Tumor aufwiesen, hatten im Vergleich zu Patienten ohne diese chromosomale Veränderung ein 4,5fach erhöhtes Risiko, an der Tumorerkrankung zu versterben (OR=4,5; 95 % CI [1,3; 16,2]).

4.3.3. Analyse des Überlebens

4.3.3.1. Kaplan-Meier-Methode

Die Analyse der Überlebenszeiten nach Kaplan-Meier zeigte eine signifikant (Log-Rank-Test, $p=0,001$) schlechtere Prognose für Patienten mit Zugewinn von 20q12 im Tumor, verglichen mit Patienten ohne Zugewinn. Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug in der Gruppe der Patienten mit Zugewinn 50 %, bei Patienten ohne Zugewinn dagegen 80 %. Die mediane Überlebenszeit lag für Patienten mit einem Tumor mit Zugewinn bei 60 Monaten. In der Gruppe der Patienten ohne Zugewinn konnte die mediane Überlebenszeit nicht bestimmt werden, da zum Ende des Beobachtungszeitraumes noch mehr als die Hälfte der Patienten am Leben waren. Als Nächstes wurden Überlebensfunktionen für die Faktoren Metastasierung, T-Kategorie und Grading erstellt. Diese Analyse ergab ein ebenfalls signifikant schlechteres Überleben für metastasierte Tumoren. Dagegen zeigten weder die T-Kategorie noch das Grading des Tumors einen signifikanten Zusammenhang zum Überleben

der Patienten dieser Kohorte. Die Funktionen sind in Abbildung 5 dargestellt. In Tabelle 12 findet sich eine Gegenüberstellung der Signifikanzwerte des Log-Rank-Tests für die einzelnen Faktoren.

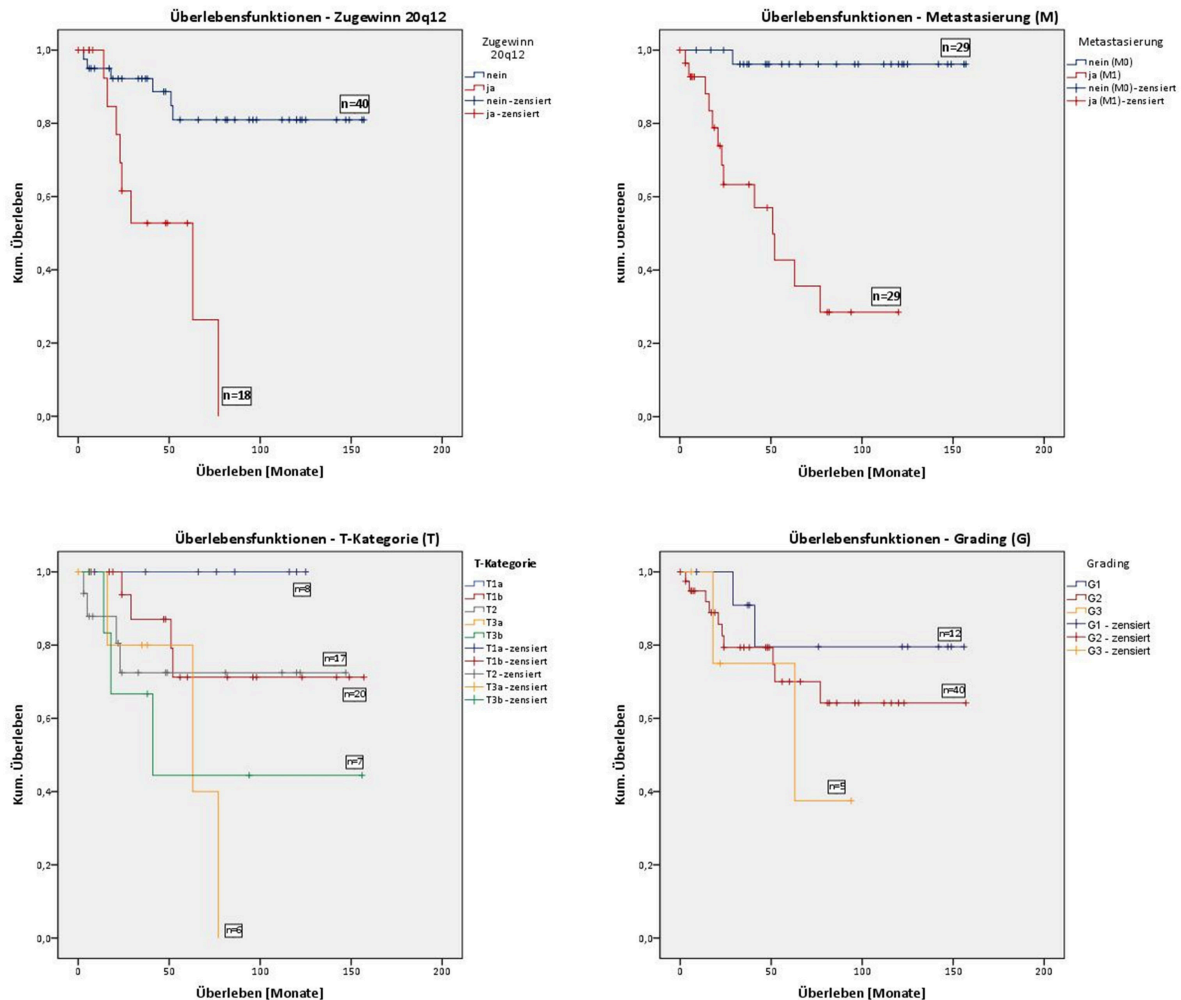


Abb. 5: Überlebensfunktionen für den Faktor Zugewinn 20q12 und zum Vergleich für die Faktoren Metastasierung, T-Kategorie und Grading

Tab. 12: Signifikanzwerte des Log-Rank-Tests für die einzelnen Faktoren

Faktor	Log-Rank-Test: Signifikanz
Zugewinn 20q12	0,000
Metastasierung (M)	0,000
T-Kategorie (T)	0,123
Grading (G)	0,415

4.3.3.2. Cox-Regression

Zur weiteren Beurteilung des Einflusses eines Zugewinns von 20q12 auf die Prognose wurde mittels Cox-Regression das Hazard-Ratio ermittelt. Zunächst wurde durch den Log-Rank-Test ein Schwellenwert bestimmt (siehe Tabelle 13). Als Schwelle mit der höchsten Signifikanz, die gleichzeitig möglichst viele Zugewinne berücksichtigt, ergab sich auch hier eine Grenze von 20 Zellen mit Zugewinn pro 100 ausgewerteten Zellen.

Mit 20 als Schwellenwert wurde nun eine Cox-Regression mit Zugewinn von 20q12 als Einflussfaktor durchgeführt (siehe Tabelle 14). Der für das Hazard-Ratio ermittelte Wert von 5,899 ($p=0,002$) bestätigt, dass das Risiko eines tumorgedingten Todes im beobachteten Zeitraum bei Tumoren mit Zugewinn deutlich erhöht ist. Zum Vergleich ist in der Tabelle auch das Hazard-Ratio für die Metastasierung als Einflussgröße aufgeführt.

Tab. 13: Übersicht über die mittels Kaplan-Meier-Analyse ermittelten Signifikanzen für den jeweiligen Schwellenwert

Schwellenwert	Signifikanz (Log-Rank-Test)
10	0,028
15	0,008
20	0,000
25	0,000
30	0,000
35	0,005
50	0,01

Tab. 14: Ergebnisse der Cox-Regression für die Einflussfaktoren Zugewinn von 20q12 und Metastasierung

Variable	Hazard-Ratio	95 % Konfidenzintervall für das Hazard-Ratio	Signifikanz (Omnibus-Test)
Zugewinn 20q12	5,899	1,958 - 17,774	0,002
Metastasierung	24,896	3,239 - 191,381	0,000

4.3.3.3. Progressionsfreies Überleben

Wie in Abbildung 6 zu sehen, zeigt auch die Analyse des progressionsfreien Überlebens, also der Entwicklung von Metastasen im Beobachtungszeitraum, eine deutlich schlechtere Prognose für Patienten mit Zugewinn von 20q12 im Tumor (Log-Rank-Test, $p=0,001$). Hierfür wurden die insgesamt 40 Tumoren betrachtet, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung noch nicht metastasiert waren. 9 davon wiesen einen Zugewinn auf.

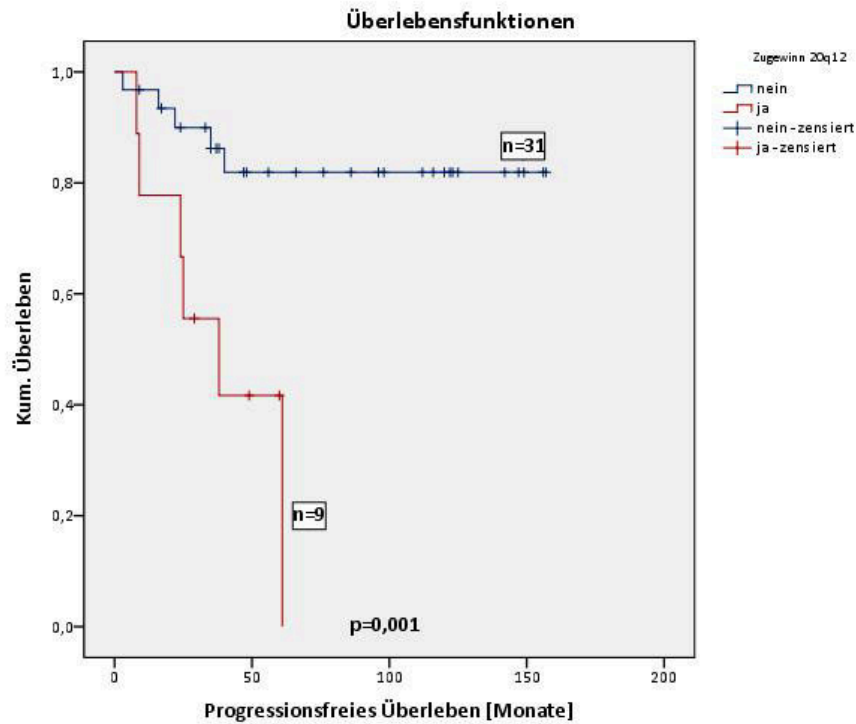


Abb. 6: Überlebensfunktion für das progressionsfreie Überleben mit dem Faktor Zugewinn von 20q12

4.4. Auswertung der Gruppe der organbegrenzten Tumoren

Die Auswertung wurde nun noch einmal gesondert für die Gruppe der organbegrenzten Tumoren mit einer T-Kategorie bis einschließlich T2 durchgeführt.

4.4.1. Tumorklassifikation und Häufigkeiten

In dieser Gruppe wurden insgesamt 45 Tumoren untersucht. Eine Übersicht über die klinischen und histopathologischen Daten findet sich in Tabelle 15.

Tab. 15: Klinische und histopathologische Daten der 45 Patienten mit organbegrenztem Tumor (Einteilung entsprechend UICC-Klassifikation von 2002)

Variable	Anzahl in % (absolut)
Metastasierung	
M0	57,8 (26)
M1	42,2 (19)
T-Kategorie	
T1a	17,8 (8)
T1b	44,4 (20)
T2	37,8 (17)
Grading	
G1	20,0 (9)
G2	75,6 (34)
G3	2,2 (1)
Angabe fehlt	2,2 (1)

4.4.2. Schwellenwert

Mit dem Schwellenwert von 20 in der Gruppe der organbegrenzten Tumoren beträgt die Sensitivität für die Metastasierung 47 %, die Spezifität 89 %. Für den tumorbedingten Tod liegt die Sensitivität bei 50 % und die Spezifität bei 78 %.

4.4.3. Relevanz eines Zugewinns von 20q12 für Metastasierung (M), Grading (G) und Überleben

4.4.3.1. Häufigkeit von Zugewinnen

Bei insgesamt 12 (26,7 %) der 45 Tumoren gab es einen Zugewinn von 20q12. Eine Übersicht über die Verteilung von Tumoren mit und ohne Zugewinn bezüglich verschiedener klinischer und histopathologischer Parameter findet sich in Tabelle 16 und ist in Abbildung 7 dargestellt.

4. Ergebnisse

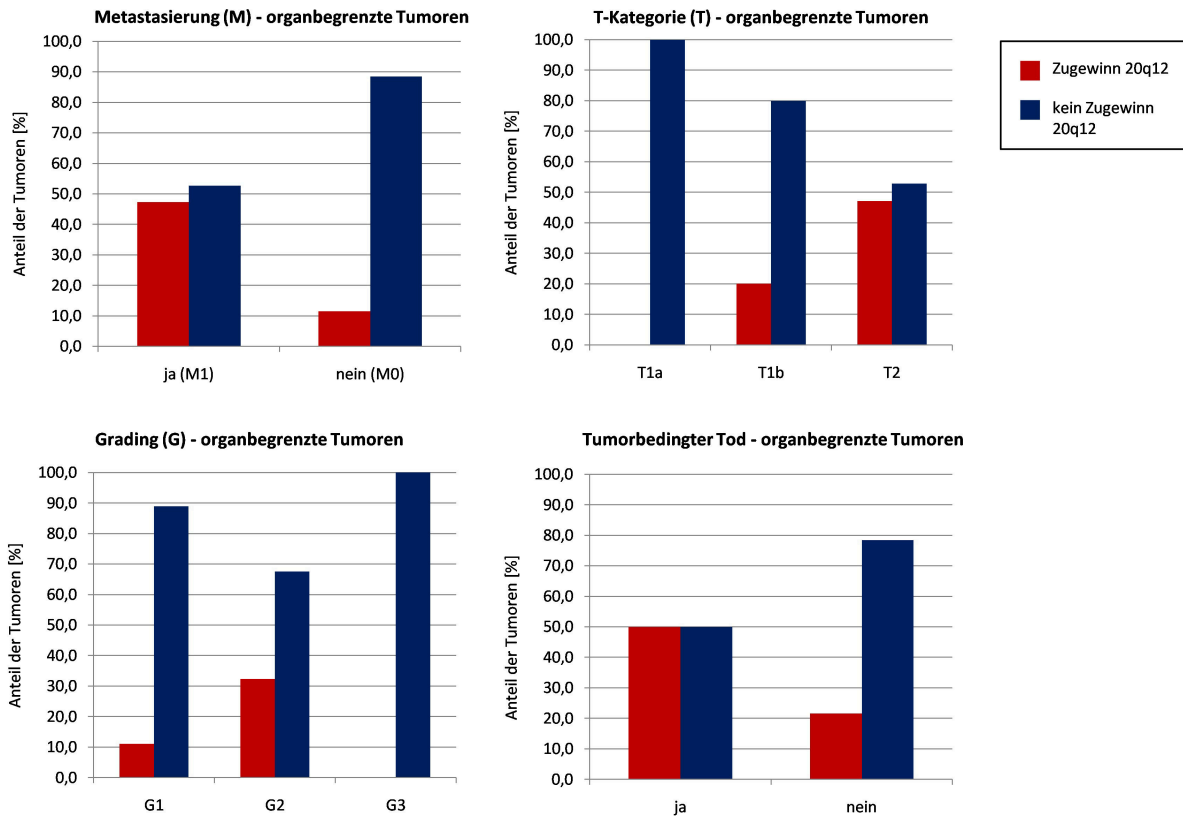


Abb. 7: Graphische Darstellung der Häufigkeit von Zugewinnen von 20q12 für Metastasierung, Grading und tumorbedingtem Tod in der Gruppe der organbegrenzten Tumoren

Tab. 16: Verteilung der Zugewinne von 20q12 für Metastasierung, T-Kategorie, Grading und tumorbedingten Tod in der Gruppe der organbegrenzten Tumoren (absolute Häufigkeit in Klammern)

	Metastasierung (M)		T-Kategorie (T)		
	ja (M1)	nein (M0)	T1a	T1b	T2
Zugewinn 20q12	47,4 % (9)	11,5 % (3)	0,0 % (0)	20,0 % (4)	47,1 % (8)
kein Zugewinn 20q12	52,6 % (10)	88,5 % (23)	100,0 % (8)	80,0 % (16)	52,9 % (9)

	Grading (G)			tumorbedingter Tod	
	G1	G2	G3	ja	nein
Zugewinn 20q12	11,1 % (1)	32,4 % (11)	0,0 % (0)	50 % (4)	21,6 % (8)
kein Zugewinn 20q12	88,9 % (8)	67,6 % (23)	100,0 % (1)	50 % (4)	78,4 % (29)

4.4.3.2. Korrelationsanalysen

4.4.3.2.1. Korrelation zur Metastasierung (M)

Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen einem Zugewinn von 20q12 und der Metastasierung gezeigt werden (Exakter Test nach Fisher, $p=0,015$). Diese kann als mittlere Korrelation bewertet werden ($\phi=0,4$). Die Risikoanalyse bestätigt, dass Tumoren mit Zugewinn ein höheres Risiko zur Metastasierung haben (OR=6,9; 95 % CI [1,5; 31,0]).

4.4.3.2.2. Korrelation zu T-Kategorie (T) und Grading (G)

Auch in der Gruppe der organbegrenzten Tumoren ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen T-Kategorie und einem Zugewinn von 20q12 (Chi-Quadrat nach Pearson, $p=0,031$), welche als mittlere Korrelation bewertet werden kann ($\phi=0,394$).

Keine signifikante Korrelation bestand zwischen einem Zugewinn von 20q12 und dem Grading (Chi-Quadrat nach Pearson, $p=0,367$).

4.4.3.2.3. Korrelation zum tumorbedingten Tod

Zwischen Zugewinn und tumorbedingtem Tod konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden (Exakter Test nach Fisher, $p=0,181$).

4.4.3.3. Analyse des Überlebens

4.4.3.3.1. Kaplan-Meier-Methode

Wie in Abbildung 8 zu sehen, zeigt die Analyse des Überlebens auch in der Gruppe der organbegrenzten Tumoren eine deutlich schlechtere Prognose für Patienten mit einem Tumor, der einen Zugewinn aufweist (Log-Rank-Test: $p=0,012$). Das 5-Jahres-Überleben lag bei Patienten mit Zugewinn bei 45 % und bei Patienten ohne Zugewinn bei 85 %. Die mediane Überlebenszeit für Patienten mit einem Zugewinn betrug 30 Monate. Zum Ende der Beobachtung lebten noch mehr als die Hälfte der Patienten, deren Tumor keinen Zugewinn aufwies, sodass das mediane Überleben für diese Gruppe nicht bestimmt werden konnte. Es wurden desweiteren Überlebensfunktionen für die Faktoren Metastasierung, T-Kategorie und Grading erstellt. Wie schon im Gesamtkollektiv war auch hier das Überleben in der Gruppe der metastasierten Tumoren deutlich schlechter. Für die T-Kategorie und das Grading waren dagegen keine signifikanten Unterschiede im Überleben zu erkennen. In Tabelle 17 sind die Signifikanzwerte des Log-Rank-Tests für die einzelnen Faktoren gegenübergestellt.

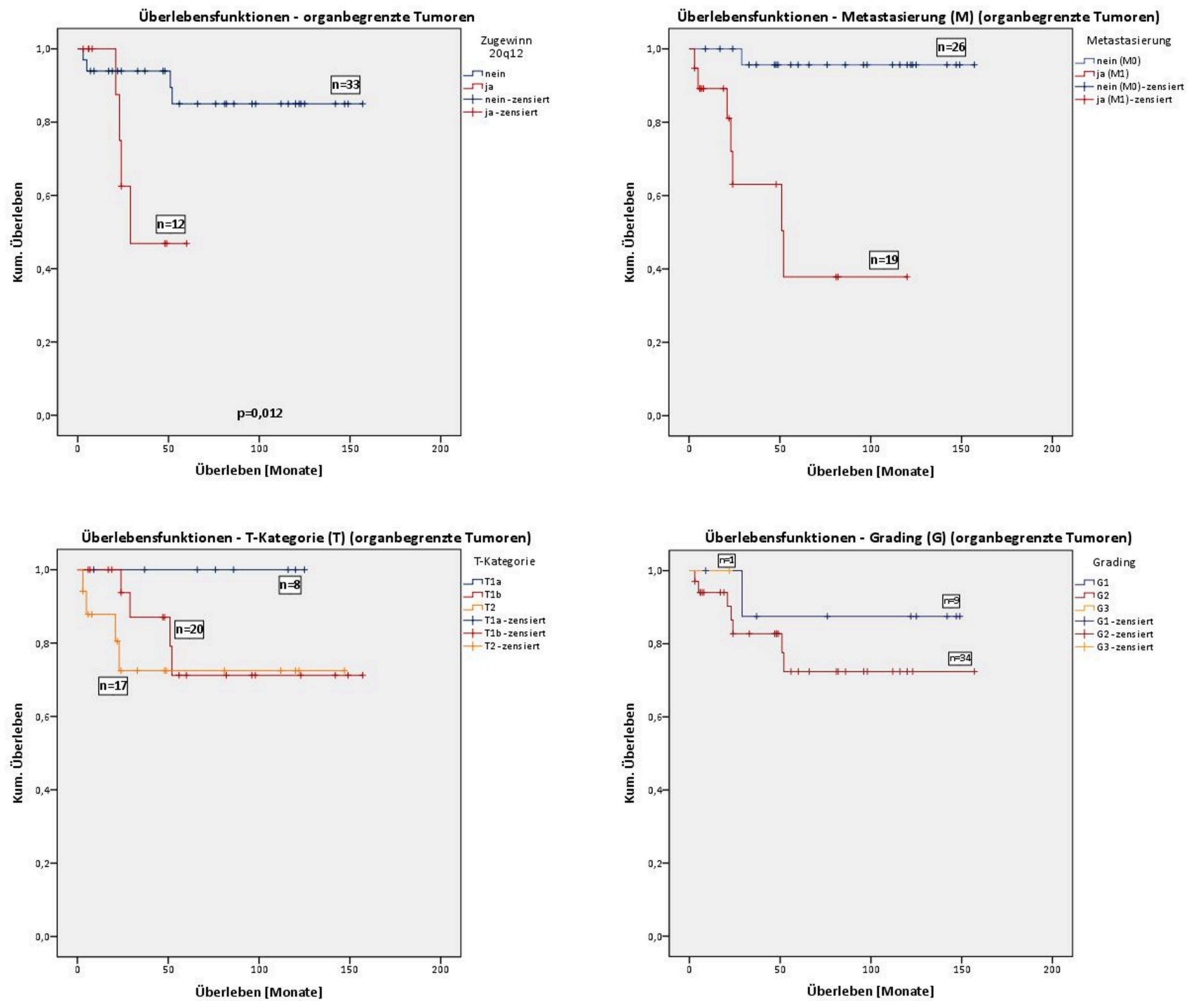


Abb. 8: Überlebensfunktionen für den Faktor Zugewinn 20q12 und zum Vergleich für die Faktoren Metastasierung, T-Kategorie und Grading für die Gruppe der organbegrenzten Tumoren

Tab. 17: Signifikanzwerte des Log-Rank-Tests für die einzelnen Faktoren

Faktor	Log-Rank-Test: Signifikanz
Zugewinn 20q12	0,012
Metastasierung (M)	0,000
T-Kategorie (T)	0,232
Grading (G)	0,681

4.4.3.3.2. Cox-Regression

Die Cox-Regression für die Gruppe der organbegrenzten Tumoren mit dem Einflussfaktor Zugewinn von 20q12 ergibt ein Hazard-Ratio von 5,538 ($p=0,028$) und damit ebenfalls ein signifikant erhöhtes Risiko des tumorbedingten Todes im beobachteten Zeitraum bei Tumoren mit Zugewinn. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Tab. 18: Ergebnisse der Cox-Regression für die Gruppe der organbegrenzten Tumoren mit dem Einflussfaktor Zugewinn von 20q12

Variable	Hazard-Ratio	95 % Konfidenzintervall für das Hazard-Ration	Signifikanz (Omnibus-Test)
Zugewinn 20q12	5,538	1,260 - 24,331	0,028

4.4.3.3. Progressionsfreies Überleben

Betrachtet man die Entwicklung von Metastasen im Beobachtungszeitraum, so kann für die Patienten mit einem Tumor mit Zugewinn eine schlechtere Prognose vermutet werden (siehe Abbildung 9). Allerdings ist dieser Zusammenhang nicht statistisch signifikant (Log Rank-Test: $p=0,222$).

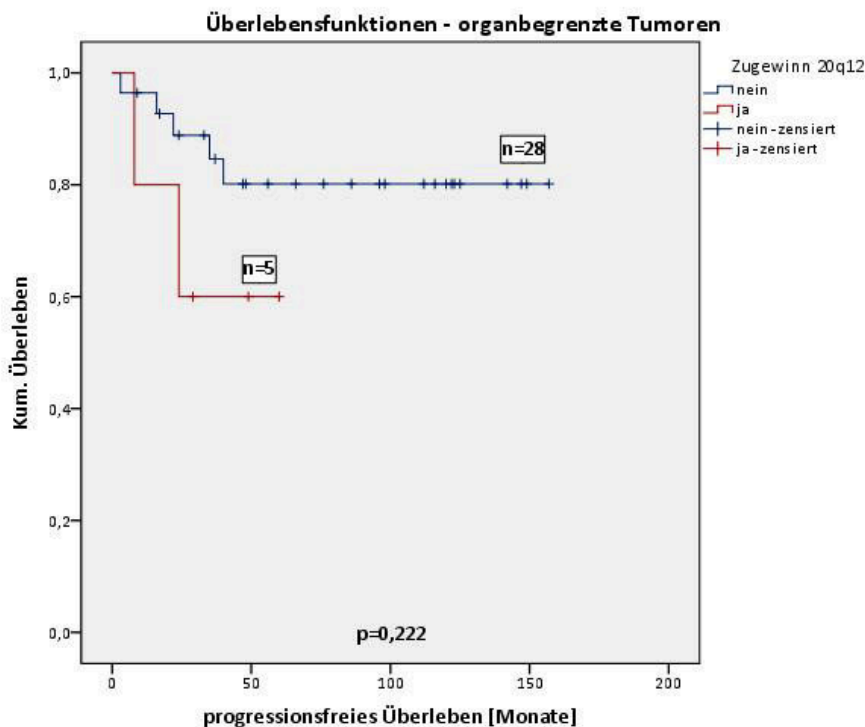


Abb. 9: Progressionsfreies Überleben in der Gruppe der organbegrenzten Tumoren

4.5. Korrelation mit den Ergebnissen der Array-CGH

Es wurde untersucht, inwiefern ein durch die FISH festgestellter Zugewinn von 20q12 (mit Schwellenwert 20) auch in der vorangegangenen Array-CGH als Zugewinn gewertet wurde. Von 50 Gewebeproben lagen Ergebnisse aus beiden Untersuchungen vor. Eine Übereinstimmung der Ergebnisse fand sich in 39 (78 %) der Fälle. Die Analyse ergab eine Korrelation nach Pearson von 0,563 ($p=0,000$) zwischen beiden Methoden. Diese kann als mittlere Korrelation bewertet werden.

5. Diskussion

In dieser Arbeit erfolgte die Evaluation einer genetischen Aberration – des Zugewinns der chromosomalen Region 20q12 - im Tumorgewebe von Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom im Rahmen einer retrospektiven Studie. Die Zielstellung beinhaltete die Frage nach der Korrelation eines Zugewinns mit Prognosefaktoren wie Metastasierung, T-Kategorie und Grading sowie dem Überleben und der Tumorprogression. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass ein Zugewinn dieser Region mit einem erhöhten Risiko sowohl zur Metastasierung als auch zum tumorbedingten Tod assoziiert war. Desweiteren war das progressionsfreie Überleben bei Tumoren mit Zugewinn verkürzt. Auch bei organbegrenzten Tumoren (bis einschließlich T2) war ein Zugewinn von 20q12 mit dem Risiko zur Metastasierung verbunden.

Im Folgenden sollen diese Resultate mit bereits vorhandenen Erkenntnissen verglichen sowie die Vor- und Nachteile der angewandten Methode und die Bedeutung der Ergebnisse für die klinische Praxis diskutiert werden.

5.1. Relevanz der untersuchten Region für die Prognosebewertung

Charakteristische chromosomale Aberrationen beim klarzelligen Nierenzellkarzinom sind die Deletion von 3p, Zugewinne von 5q und Verluste von 6q, 8p, 9p und 14q. (Lopez-Beltran et al. 2006) Auch Zugewinne von 20q wurden in mehreren Studien beschrieben. Beroukhim et al. analysierten die Genexpression von mehr als 90 VHL-assoziierten - und sporadischen klarzelligen Nierenzellkarzinomen und fanden bei 20 % der Tumoren eine signifikante Überexpression von Genen der Region 20q13.33. (Beroukhim et al. 2009) Auch Gunawan et al. beobachteten Zugewinne von 20q in 10,2 % der Fälle bei der zytogenetischen Untersuchung von 118 primären klarzelligen Nierenzellkarzinomen. (Gunawan et al. 2001) Auf die prognostische Aussagekraft von Veränderungen dieser Region wird in den genannten Studien allerdings nicht eingegangen.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei 31 % aller untersuchten Tumorgewebe ein Zugewinn von 20q12 nachgewiesen werden. Die höhere Frequenz der Veränderung in unserer Studie könnte durch die höhere Sensitivität der FISH im Vergleich zum Giemsa-Banding und der SNP-Analyse, die in den anderen Studien angewendet wurden, erklärt werden. Auf die Vor- und Nachteile der CGH und der FISH wird im Kapitel 5.3. eingegangen.

Es wurde nun die Korrelation zwischen einem Zugewinn und klinisch relevanten Tumormerkmalen ausgewertet.

Die Entwicklung von Metastasen ist der wichtigste Prognosefaktor beim klarzelligen Nierenzellkarzinom. So liegt die 5-Jahres-Überlebensrate für fernmetastasierte Nierenzellkarzinome bei 10,6 %, für lokal begrenzte Tumoren hingegen bei über 90 %. (<http://www.seer.cancer.gov>) Im hier untersuchten Patientenkollektiv konnte eine höchst signifikante Korrelation zwischen einem Zugewinn von 20q12 und der Metastasierung belegt werden. Bei den metastasierten Tumoren war ein Zugewinn in 51,7 %, bei den nicht metastasierten Tumoren jedoch nur in 10,3 % der Fälle nachweisbar. Auch die Risikoanalyse bestätigte, dass ein Zugewinn von 20q12 mit einem erhöhten Risiko zur Metastasierung verbunden ist. Eine signifikante Korrelation ergab sich ebenfalls zur T-Kategorie, einem weiteren bedeutenden Faktor beim Staging des Tumors. Für das Grading konnte kein signifikanter Zusammenhang mit einem Zugewinn nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde das krankheitsspezifische Überleben im Hinblick auf den Einfluss eines Zugewinns von 20q12 analysiert. 57,1 % der Patienten, die durch den Tumor bedingt verstarben, wiesen einen Zugewinn im Tumorgewebe auf. Bei den Patienten, die unabhängig von der Tumorerkrankung verstarben, war dagegen nur in 22,7 % ein Zugewinn nachweisbar. Auch hier zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen Zugewinn und tumorbedingtem Tod. Zur weiterführenden Analyse des Überlebens wurden mittels Kaplan-Meier-Methode Überlebensfunktionen mit dem Faktor Zugewinn und zum Vergleich mit den Faktoren Metastasierung, T-Kategorie und Grading erstellt. Wie erwartet, war dabei die Metastasierung der aussagekräftigste Prognosefaktor. Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug bei Patienten mit metastasiertem Tumor 35 %, bei Patienten mit nicht metastasiertem Tumor 95 %. Interessanterweise konnte für die in der klinischen Routine angewendeten Prognosefaktoren T-Kategorie und Grading in dieser Arbeit kein signifikanter Zusammenhang mit dem Überleben nachgewiesen werden. Dagegen war der Zugewinn von 20q12 wie die Metastasierung mit einem signifikant kürzeren Überleben assoziiert. Die 5-Jahres-Überlebensrate lag für Tumoren mit Zugewinn bei 50 %, bei Tumoren ohne Zugewinn indessen bei 80 %. Dieses Ergebnis wurde durch das ermittelte Hazard-Ratio bestätigt. Die fehlende Korrelation von T-Kategorie und Grading zum Überleben muss allerdings unter dem

Aspekt betrachtet werden, dass vor allem in den hohen Kategorien die Fallzahl gering war. Um diesen Trend zu bestätigen, sind Studien mit einer größeren Patientenzahl notwendig.

Eine weitere Fragestellung von klinischer Relevanz ist die nach dem Einfluss genetischer Aberrationen auf die Tumorprogression. Dazu wurden die Überlebensfunktionen der zum Diagnosezeitpunkt noch nicht metastasierten Tumoren analysiert. Für Tumoren mit Zugewinn von 20q12 ergab sich eine signifikant schlechtere Prognose. Auch primär nicht metastasierte Tumoren, die einen Zugewinn aufwiesen, hatten also verglichen mit Tumoren ohne Zugewinn ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von Metastasen im Krankheitsverlauf.

In Deutschland werden Nierenzellkarzinome zu 74 % in frühen Tumorstadien (T1 und T2) diagnostiziert. (RKI und GEKID 2012) Hinsichtlich der Entscheidung zwischen chirurgischer Resektion, minimalinvasiven Verfahren oder aktiver Beobachtung, aber auch bezüglich einer adjuvanten systemischen Therapie ist eine Aussage über die Prognose von besonderer Bedeutung. Daher wurde die Auswertung für die Gruppe der organbegrenzten Tumoren noch einmal gesondert durchführt. Die Ergebnisse entsprachen weitgehend denen des Gesamtkollektivs. 26,7 % der in dieser Gruppe untersuchten Tumoren wiesen einen Zugewinn auf. Für Metastasierung und T-Kategorie ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zum Zugewinn von 20q12. Zum Grading, allerdings auch zum tumorbedingten Tod, konnte keine signifikante Assoziation nachgewiesen werden. In der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier waren Metastasierung und Zugewinn relevante Prognosefaktoren, während für T-Kategorie und Grading kein signifikanter Zusammenhang zum Überleben bestand. Das ermittelte Hazard-Ratio zeigt ebenfalls ein erhöhtes Risiko zum tumorbedingten Tod bei Tumoren mit Zugewinn. Eine - allerdings statistisch nicht signifikante - Tendenz zur schlechteren Prognose war auch bei der Analyse des progressionsfreien Überlebens zu erkennen. In weiterführenden Untersuchungen, die im Forschungslabor der Klinik für Urologie des UKJ an einer Kohorte von insgesamt 100 Patienten durchgeführt wurden, bestätigte sich diese Tendenz und erwies sich als signifikant ($p=0.000002$; Hazard Ratio=9,9). (unveröffentlichte Daten von Sanjmyatav)

5.2. Relevanz der untersuchten Region für Tumorgenese und -progression

Die Entstehung und Progression von Neoplasien ist ein komplexer Vorgang, an dem verschiedenste Faktoren beteiligt sind. Eigenschaften von zentraler Bedeutung für

Tumorzellen sind die Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen, die Fähigkeit, Apoptose und externe Wachstumsregulierung zu umgehen, sowie die Möglichkeit zur unbegrenzten Replikation, Induktion von Angiogenese und Invasion von Geweben und damit zur Metastasierung. Die wichtigste Ursache für die genannten Eigenschaften, die Tumorzellen Überleben, Progression und Dissemination ermöglichen, stellen genetische Veränderungen dar. Diese werden bei den jeweiligen Tumorentitäten durch verschiedene Mechanismen und in unterschiedlichen Stufen der Tumorgenese erworben. (Hanahan und Weinberg 2011) Ein denkbarer Mechanismus ist die Aktivierung von Onkogenen. Diese regulieren in gesunden Zellen Wachstum und Zellteilung und unterliegen einer komplexen Kontrolle. In Folge von Amplifikationen, Punktmutationen oder chromosomalen Rearrangements kommt es zur pathologischen Aktivierung von Onkogenen, was zu einem Funktionsgewinn führt. Durch Punktmutationen oder Rearrangements kommt es zur Produktion eines veränderten oder neuartigen Genprodukts. Bei Amplifikationen hingegen liegen multiple Kopien eines strukturell unveränderten Onkogens vor, was zu einer enormen Steigerung der Synthese des Genprodukts führen kann. In normalen Zellen führt die pathologische Expression von Onkogenen zu einem Stillstand des Zellzyklus. Verantwortlich dafür sind wahrscheinlich reaktive Mechanismen der Zelle, wobei durch Stimulation von Onkogenen eine DNA-Reparatur-Antwort getriggert wird. Nur wenn auch dieser Reparaturmechanismus fehlerhaft ist, kommt es zur Proliferation der Zelle. (Strachan und Read 2011)

Veränderungen der chromosomalen Region 20q werden auch bei anderen Tumorentitäten beschrieben, zum Beispiel bei Tumoren des Gastrointestinaltrakts. So finden sich Zugewinne von 20q häufig beim Kolonkarzinom und sind bei diesem mit der prognostisch ungünstigen Lebermetastasierung assoziiert. (Korn et al. 1999, Ghadimi et al. 2003) Kimura et al. beschreiben das Auftreten von Zugewinnen dieser Region beim Magenkarzinom. (Kimura et al. 2004) Weiterhin fanden Mahlamäki et al. in 90 % der untersuchten Zelllinien beim Pankreaskarzinom Zugewinne von 20q. (Mahlamäki et al. 2002) Beim Mammakarzinom sind Amplifikationen von 20q13 mit einer geringen Differenzierung und einem verkürzten progressionsfreien Überleben assoziiert. Für die Gruppe der N-negativen Tumoren stellt diese Amplifikation einen signifikanten Prognosefaktor da. (Tanner et al. 1995) Zugewinne von 20q13 werden ebenfalls beim Ovarialkarzinom beobachtet. (Iwabuchi et al. 1995) Wong et al. beschreiben den Zugewinn von 20q als eine der häufigsten Veränderungen des

Adenokarzinoms der Lunge bei Nichtrauchern. (Wong et al. 2003) Bei einem hohen Grad an Amplifikationen in den Tumorzellen von Osteosarkomen ist die Region 20q laut einer Studie von Bayani et al. überproportional häufig an strukturellen Rearrangements beteiligt. (Bayani et al. 2003)

Diese Fakten deuten darauf hin, dass es durch den Zugewinn dieser Region zur erhöhten Expression möglicher Proto-Onkogene (Gendosiseffekt) kommt. Der signifikante Unterschied in der Prognose zwischen Tumoren mit und ohne Zugewinn von 20q lässt vermuten, dass diese Region Onkogene mit Einfluss auf Metastasierung und Tumorprogression enthält. Potentielle Onkogene auf dem Lokus 20q sind E2F1 (20q11.2), MMP9 (2q11.2-q13.1), HCK (20q11-q12) und BCL2L1 (20q11.21). (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Der Transkriptionsfaktor E2F1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose. E2F1 ermöglicht das Überschreiten des „Restriktionspunktes“ in der G1-Phase des Zellzyklus, was zur Progression in die S-Phase und damit zur DNA-Replikation und Zellteilung führt. Das Fortschreiten aus der frühen G1-Phase zum Restriktionspunkt ist von der Phosphorylierung des Tumorsuppressorproteins Rb abhängig. Nicht phosphoryliertes Rb bildet mit E2F1 einen Komplex, welcher durch die Phosphorylierung aufgelöst wird. Das freigesetzte E2F1 initiiert nun die Transkription von Genen, deren Produkte für die DNA-Synthese und die Progression des Zellzyklus erforderlich sind. Eine von äußeren Faktoren unabhängige Proliferation ist ein Kennzeichen von Tumorzellen. Bei unterschiedlichen Tumoren findet sich eine Mutation des Rb-Gens oder - bei intaktem Rb - eine Fehlfunktion des Rb-E2F1-Signalwegs. (Wyllie 2002) In Zellkulturen konnte außerdem gezeigt werden, dass die verstärkte Expression von E2F1 zur Apoptose führt. Ein Mechanismus ist dabei unter anderem die Stabilisierung des Tumorsuppressorproteins p53. (Hiebert et al. 1995) Die beschriebenen Signalwege sind in Abbildung 10 schematisch dargestellt. Die simultane Beeinflussung von Proliferation und Apoptose scheint Teil eines grundlegenden Regulationsmechanismus zu sein, der die Apoptoseschwelle in proliferierenden Geweben senkt und somit vor unerwünschten Konsequenzen der DNA-Replikation, wie der Tumorentstehung, schützt. Genetische Veränderungen, die diesen Signalweg betreffen, können eine Dysregulation dieses Gleichgewichts bedingen und dadurch eine pathologische Proliferation ermöglichen. (Wyllie 2002)

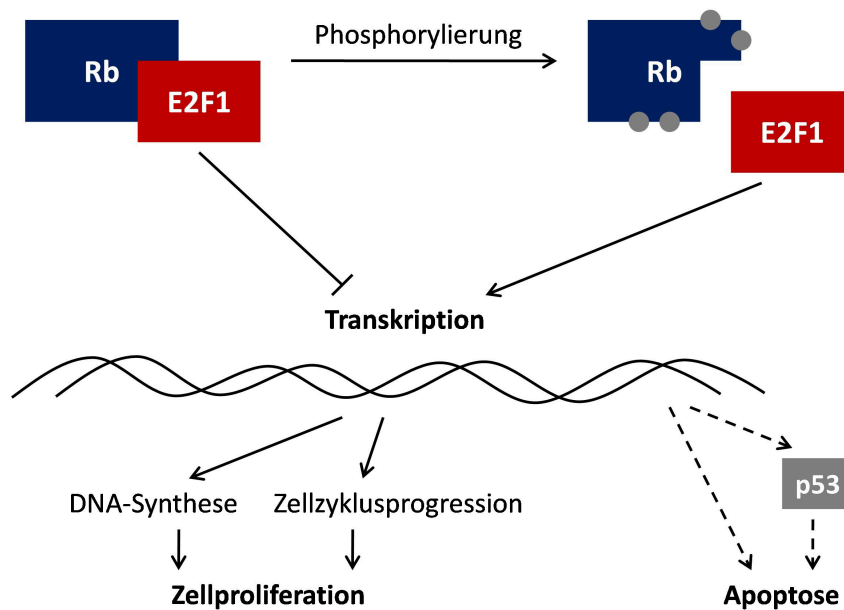


Abb. 10: Schematische Darstellung der von E2F1 regulierten Signalwege, modifiziert nach Wyllie 2002

Eine fehlregulierte Expression bzw. Alterationen des E2F1-Gens wurden bei mehreren Tumorentitäten nachgewiesen. Beispielsweise ist die Expression von E2F1 beim duktalem Mammakarzinom im Vergleich zum Normalgewebe signifikant erhöht. Auch korrelierte eine Überexpression von E2F1 mit klinischen Prognoseparametern wie einer geringen histologischen Differenzierung und einem fortgeschrittenen Tumorstadium. (Zhang et al. 2000) Ebenso fand sich eine Überexpression von E2F1 beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom. (Imai et al. 2004) Alla et al. konnten anhand eines Modells beim malignen Melanom zeigen, dass E2F1 für Progression und Aggressivität dieses Tumors von entscheidender Bedeutung ist. Der Knockdown des endogenen E2F1 reduzierte das invasive Potential der Tumorzellen. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass der Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR ein direktes Ziel von E2F1 darstellt, eine Interaktion, die ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Tumorprogression spielen könnte. (Alla et al. 2010)

Die Proteine der Matrix-Metalloproteinase (MMP)-Familie bauen extrazellulär Kollagen ab und sind am Gewebeumbau bei pathologischen Prozessen, wie Entzündung, Tumordinvasion und Metastasierung, beteiligt. Es wird angenommen, dass MMP9 als Tumorangio- und Angiogenesefaktor über den VEGF-Signalweg wirkt. (Bergers et al. 2000) Hiratsuka et

al. konnten zeigen, dass extrapulmonale Primärtumoren verschiedener Entitäten MMP9 im Lungengewebe stimulieren und damit das Risiko zur Metastasierung erhöhen. (Hiratsuka et al. 2002) Langers et al. wiesen nach, dass eine erhöhte Expression von MMP9 in der Darmmukosa beim kolorektalen Karzinom mit einem verschlechterten 5-Jahres-Überleben korreliert. (Langers et al. 2012)

HCK (hematopoietic cell kinase) gehört zur Familie der SRC-Tyrosinkinasen, die Differenzierung, Überleben, Migration und Adhäsion von Zellen vermitteln. HCK wird primär in Zellen der myeloischen Reihe exprimiert. Eine vermehrte Expression von HCK ist bei Mäusen wesentlich mit Zellproliferation und Tumorgenese assoziiert. Ein möglicher Mechanismus ist die Beteiligung an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts. (Poincloux et al. 2009)

BCL2L1 codiert für ein mitochondriales Membranprotein, welches zur Familie der BCL2-Proteine gehört. Diese regulieren den programmierten Zelltod bzw. die stressinduzierte Apoptose, wobei BCL2L1 apoptosehemmend wirkt. Durch diesen Mechanismus könnte durch eine vermehrte Expression des Gens die Lebensspanne von Zellen verlängert werden und in Folge dessen das Risiko für onkogene Mutationen steigen. (Coultas und Strasser 2003) Die erhöhte Expression des Gens ist beim Pankreaskarzinom mit Überleben und Lymphknotenmetastasierung assoziiert. (Loukopoulos et al. 2007)

Welches dieser Gene in die Tumorprogression des Nierenzellkarzinoms involviert ist, müssen weiterführende Expressionsanalysen zeigen.

5.3. Methodik: Vergleich zu den Ergebnissen der Array-CGH, mögliche Probleme bei der Auswertung

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war der Vergleich der Ergebnisse der FISH mit den zugrunde liegenden Array-CGH-Daten.

Die Array-CGH ist eine hochauflösende Screeningmethode und als solche vor allem zur Detektion noch nicht bekannter genetischer Aberrationen geeignet. Wie die FISH kann die Array-CGH auch an nicht proliferierenden Zellen durchgeführt werden. Allerdings ist diese Technik zeitaufwendig und in der klinischen Verfügbarkeit begrenzt. Eine Limitation der Methode besteht weiterhin darin, dass Veränderungen, die nur in einem kleinen Anteil der

Tumorzellen (unter 30-50 %) auftreten, unterhalb der Detektionsschwelle liegen können und nicht erfasst werden. Mit der konventionellen CGH können genomische Imbalancen detektiert werden, die in über 50 % der zu untersuchenden Zellen vorhanden sind. Bei der Array-CGH liegt die Detektionsschwelle niedriger, bei ca. 30 %. (Lichter et al. 1995, De Witte et al. 2006) Durch die FISH werden Aberrationen in einzelnen Zellen identifiziert. So können auch Veränderungen in einem geringen Zellanteil erfasst werden. (Tibiletti 2004) Zum Nachweis bekannter genetischer Aberrationen stellt die Interphase-FISH daher als schnell durchführbare, effektive Methode eine Alternative zur CGH dar. Die kombinierte Anwendung beider Methoden hilft, Limitationen zu vermindern und genaue Informationen über die komplexen genetischen Veränderungen in Tumorzellen zu erhalten. (Sanjmyatav et al. 2005)

Im Vergleich der FISH-Ergebnisse mit den Array-CGH-Daten ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen den beiden Techniken. Dies bestätigt, dass die Interphase-FISH eine geeignete Methode zur Validierung von CGH-Ergebnissen ist.

Probleme bei der Auswertung der Interphase-FISH ergeben sich, wenn es durch die zweidimensionale Darstellung des eigentlich dreidimensionalen Zellkerns zur Kolo-kalisation von zwei Signalen kommt. Genauso können einzelne Signale im Interphasekern aber auch gesplittet sein. Um daraus resultierende falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wurde an einer Serie von Normalgeweben ein Cut-Off-Wert ermittelt. Dieser ist für jede Sonde und für jedes Zellmaterial unterschiedlich und muss jeweils spezifisch bestimmt werden. (Kearney 2001, Tibiletti 2004) Eine weitere Schwierigkeit stellt die Evaluation der Signale in polyploiden Tumorzellen dar. Bei einigen Tumoren treten Polyploidien des gesamten Genoms auf, welche anhand der regionenspezifischen Sonde allein nicht von spezifischen Zugewinnen zu unterscheiden sind. Zur besseren Auswertung wurde daher in dieser Arbeit als Polyploidie-Kontrolle eine Zentromersonde für Chromosom 2 eingesetzt, eine Region, die in der Array-CGH-Untersuchung fast ausschließlich einen normalen Karyotyp zeigte. Das Vorhandensein von Zugewinnen von 20q12 wurde dann in Bezug auf Chromosom 2 ausgewertet.

5.4. Klinische Relevanz der Ergebnisse

Der Krankheitsverlauf beim Nierenzellkarzinom ist - auch bei Patienten mit gleichem histologischen Subtyp, Tumorstadium und Grading - sehr variabel und die individuelle Prognosebewertung stellt ein Problem in der klinischen Praxis dar.

Molekulare Marker sind in Gewebe, Blut oder Urin nachweisbare molekulare Expressionsmuster (Gene, Proteine, miRNA) oder genomische Veränderungen. Ihre Analyse könnte bei lokal begrenzten Tumoren zur Beurteilung der Aggressivität und zu einer risikoadaptierten Nachsorge beitragen. Im fortgeschrittenen Tumorstadium wären mit Hilfe molekularer Marker eine Vorhersage des Therapieansprechens und die Einteilung der Patienten in Risikogruppen zur Therapieauswahl möglich. (Arsanious et al. 2009)

Verschiedene Prognosemodelle, die mehrere klinische Parameter kombinieren (siehe 1.7.), zeigen eine höhere Genauigkeit als die TNM-Klassifikation oder das Grading allein (Lane und Kattan 2005), sind aber für die individuelle Prognosebewertung dennoch nicht ausreichend. Durch Integration molekularer Marker in solche Prognosemodelle kann deren Aussagekraft erhöht werden. Kim et al verglichen die prognostische Validität von herkömmlichen Parametern beim Nierenzellkarzinom - TNM und Grading - sowie das Prognosemodell der University of California Los Angeles (UISS) mit einem Modell, welches klinische Daten (Metastasierungsstatus, T-Kategorie, ECOG PS) und zusätzlich Proteinexpressionsprofile (p53, CA9, Vimentin) berücksichtigt. Sowohl bei Patienten mit lokal begrenzten als auch mit metastasierten Tumoren zeigte dieses kombinierte Modell eine signifikant höhere Genauigkeit. (Kim et al. 2004)

Auch im Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit war der Zugewinn von 20q12 ein genauerer Prognoseparameter als T-Kategorie und Grading. In Untersuchungen des Forschungslabors der Klinik für Urologie des UKJ waren neben dem hier beschriebenen Zugewinn von 20q12 auch Veränderungen der Regionen 1q, 7q und 9p mit Metastasierung und verkürzten krankheitsspezifischen Überleben assoziiert. (Sanjmyatav et al. 2011) Auch Brunelli et al. führten die FISH beim klarzelligen Nierenzellkarzinom durch und beobachteten ein signifikant schlechteres krankheitsspezifisches Überleben bei einem Verlust von 9p. (Brunelli et al. 2008) Eine Zielstellung für weitere Studien wäre die Entwicklung eines FISH-

Sondensets, das durch Kombination mehrerer spezifischer genetischer Aberrationen eine Prognosebewertung ermöglicht und in der Routinediagnostik eingesetzt werden kann.

Abgesehen von der Prognosebewertung ist eine weitere potentielle Einsatzmöglichkeit für molekulare Marker die Vorhersage des Ansprechens auf molekulare Therapien bei metastasierten Tumoren. Bisher existieren keine etablierten Marker, die das individuelle Ansprechen vorhersagen und somit die Auswahl von Patienten für bestimmte Therapien erleichtern können. (Arsanious et al. 2009) Ein Beispiel für die Anwendung eines molekularen Markers in der klinischen Routine ist der HER2/neu-Rezeptorstatus beim metastasierten Mammakarzinom. Patientinnen mit positivem Rezeptorstatus haben eine ungünstigere Prognose, sprechen aber gut auf den monoklonalen Antikörper Trastuzumab an, mit dem sie zusätzlich zur Chemotherapie behandelt werden. (Ross et al. 2003)

5.5. Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die chromosomale Region 20q12 für die Prognose des klarzelligen Nierenzellkarzinoms relevant ist. Zur weiteren Evaluation dieser Daten und zur Identifikation von an der Tumorprogression beteiligten Genen ist die Analyse von Veränderungen dieser Region in prospektiven Studien notwendig. Aufgrund der relativ geringen Fallzahl in der vorliegenden Arbeit war der Nachweis der Unabhängigkeit von 20q12 als molekularer Marker von anderen Prognosefaktoren durch die Multivariatanalyse nicht möglich. Auch hierfür ist die Kontrolle in Studien mit größerem Umfang erforderlich.

6. Schlussfolgerung

Ziel dieser Arbeit war die Validierung der prognostischen Wertigkeit von Aberrationen der chromosomalen Region 20q12 beim klarzelligen Nierenzellkarzinom.

Zugewinne dieser Region korrelierten sowohl mit der Metastasierung als auch mit dem krankheitsspezifischen Überleben. Das erhöhte Risiko zur Metastasierung war auch in der Gruppe der organbegrenzten Tumoren (bis einschließlich T2) nachzuweisen. Dies lässt vermuten, dass Gene auf diesem Locus eine bedeutende Rolle für die Tumorprogression und -aggressivität spielen. Ziel zukünftiger Studien sollte es sein, diese Ergebnisse in prospektiven Untersuchungen zu bestätigen und mögliche Kandidatengene zu identifizieren.

Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es möglich ist, anhand von genetischen Veränderungen des Primärtumors Aussagen über die Prognose des klarzelligen Nierenzellkarzinoms zu treffen. Die FISH stimmte dabei mit den Ergebnissen der zugrundeliegenden Array-CGH-Untersuchung überein und erwies sich als geeignete Methode zum Nachweis von bekannten genetischen Aberrationen.

Durch Addition weiterer spezifischer genetischer Aberrationen zur beschriebenen Region wäre es möglich, ein kombiniertes FISH-Sondenset zu entwickeln, das zur Prognosebewertung in der Routinediagnostik angewandt werden kann. Ein solcher Test könnte durch Integration in bereits verwendete Prognosemodelle deren Genauigkeit erhöhen und somit die individuelle Therapieplanung und Nachsorge erleichtern sowie helfen, Patienten für bestimmte molekulare Therapien auszuwählen.

Literaturverzeichnis

<http://www.seer.cancer.gov>

<http://www.uicc.org/tnm>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Alla V, Engelmann D, Niemetz A, Pahnke J, Schmidt A, Kunz M, Emmrich S, Steder M, Koczan D, Pützer BM. 2010. E2F1 in melanoma progression and metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 102 (2):127-133.

Anglard P, Tory K, Brauch H, Weiss GH, Latif F, Merino MJ, Lerman MI, Zbar B, Linehan WM. 1991. Molecular analysis of genetic changes in the origin and development of renal cell carcinoma. *Cancer Res*, 51 (4):1071-1077.

Arsanious A, Bjarnason GA, Yousef GM. 2009. From bench to bedside: current and future applications of molecular profiling in renal cell carcinoma. *Mol Cancer*, 8:20.

Bayani J, Zielenska M, Pandita A, Al-Romaih K, Karaskova J, Harrison K, Bridge JA, Sorensen P, Thorner P, Squire JA. 2003. Spectral karyotyping identifies recurrent complex rearrangements of chromosomes 8, 17, and 20 in osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 36 (1):7-16.

Bedke J, Buse S, Kurosch M, Haferkamp A, Jäger D, Hohenfellner M. 2007. [Paraneoplastic syndrome in renal cell carcinoma]. *Urologe A*, 46 (1):45-48.

Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. 2000. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol*, 2 (10):737-744.

Beroukhim R, Brunet JP, Di Napoli A, Mertz KD, Seeley A, Pires MM, Linhart D, Worrell RA, Moch H, Rubin MA, Sellers WR, Meyerson M, Linehan WM, Kaelin WG, Signoretti S. 2009. Patterns of gene expression and copy-number alterations in von-hippel lindau disease-associated and sporadic clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res*, 69 (11):4674-4681.

Bodmer D, van den Hurk W, van Groningen JJ, Eleveld MJ, Martens GJ, Weterman MA, van Kessel AG. 2002. Understanding familial and non-familial renal cell cancer. *Hum Mol Genet*, 11 (20):2489-2498.

Brugarolas J. 2007. Renal-cell carcinoma--molecular pathways and therapies. *N Engl J Med*, 356 (2):185-187.

Brunelli M, Eccher A, Gobbo S, Ficarra V, Novara G, Cossu-Rocca P, Bonetti F, Menestrina F, Cheng L, Eble JN, Martignoni G. 2008. Loss of chromosome 9p is an independent

prognostic factor in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Mod Pathol*, 21 (1):1-6.

Childs R, Chernoff A, Contentin N, Bahceci E, Schrump D, Leitman S, Read EJ, Tisdale J, Dunbar C, Linehan WM, Young NS, Barrett AJ. 2000. Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. *N Engl J Med*, 343 (11):750-758.

Chow WH, Gridley G, Fraumeni JF, Järnholm B. 2000. Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. *N Engl J Med*, 343 (18):1305-1311.

Cohen HT, McGovern FJ. 2005. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 353 (23):2477-2490.

Coll DM, Smith RC. 2007. Update on radiological imaging of renal cell carcinoma. *BJU Int*, 99 (5 Pt B):1217-1222.

Coppin C, Le L, Porzsolt F, Wilt T. 2008. Targeted therapy for advanced renal cell carcinoma. *Cochrane Database Syst Rev*, (2):CD006017.

Coppin C, Porzsolt F, Awa A, Kumpf J, Coldman A, Wilt T. 2005. Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, (1):CD001425.

Coultas L, Strasser A. 2003. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol*, 13 (2):115-123.

De Witte A, Nair M, Mehta K, Ghosh J, Scheffer A, Cifuentes F, Suela J, Garcia M. 2006. 60-mer Oligo-Based Comparative Genomic Hybridization Agilent Technologies, Inc.

Decker J, Brauch H. 2002. Nierenzellkarzinome. In: Ganten D, Ruckpaul K, Hrsg. *Molekularmedizinische Grundlagen von nicht-hereditären Tumorerkrankungen*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 257-289.

Eichelberg C, Junker K, Ljungberg B, Moch H. 2009. Diagnostic and prognostic molecular markers for renal cell carcinoma: a critical appraisal of the current state of research and clinical applicability. *Eur Urol*, 55 (4):851-863.

Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, Chevreau C, Filipek M, Melichar B, Bajetta E, Gorbunova V, Bay JO, Bodrogi I, Jagiello-Gruszczyk A, Moore N, investigators AT. 2007a. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet*, 370 (9605):2103-2111.

Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Freeman S, Schwartz B, Shan M, Simantov R, Bukowski RM, Group TS. 2007b. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 356 (2):125-134.

- Fuhrman SA**, Lasky LC, Limas C. 1982. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 6 (7):655-663.
- Gago-Dominguez M**, Yuan JM, Castela JE, Ross RK, Yu MC. 1999. Regular use of analgesics is a risk factor for renal cell carcinoma. *Br J Cancer*, 81 (3):542-548.
- Ghadimi BM**, Grade M, Liersch T, Langer C, Siemer A, Füzesi L, Becker H. 2003. Gain of chromosome 8q23-24 is a predictive marker for lymph node positivity in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 9 (5):1808-1814.
- Gnarra JR**, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, Latif F, Liu S, Chen F, Duh FM. 1994. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet*, 7 (1):85-90.
- Grossman E**, Messerli FH, Goldbourt U. 1999. Does diuretic therapy increase the risk of renal cell carcinoma? *Am J Cardiol*, 83 (7):1090-1093.
- Gunawan B**, Huber W, Holtrup M, von Heydebreck A, Efferth T, Poustka A, Ringert RH, Jakse G, Füzesi L. 2001. Prognostic impacts of cytogenetic findings in clear cell renal cell carcinoma: gain of 5q31-qter predicts a distinct clinical phenotype with favorable prognosis. *Cancer Res*, 61 (21):7731-7738.
- Hanahan D**, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144 (5):646-674.
- Hiebert SW**, Packham G, Strom DK, Haffner R, Oren M, Zambetti G, Cleveland JL. 1995. E2F-1:DP-1 induces p53 and overrides survival factors to trigger apoptosis. *Mol Cell Biol*, 15 (12):6864-6874.
- Hiratsuka S**, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, Shibuya M. 2002. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell*, 2 (4):289-300.
- Huang WC**, Levey AS, Serio AM, Snyder M, Vickers AJ, Raj GV, Scardino PT, Russo P. 2006. Chronic kidney disease after nephrectomy in patients with renal cortical tumours: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol*, 7 (9):735-740.
- Hudes G**, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I, Kovacevic Z, Lesovoy V, Schmidt-Wolf IG, Barbarash O, Gokmen E, O'Toole T, Lustgarten S, Moore L, Motzer RJ, Trial GA. 2007. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 356 (22):2271-2281.
- Hunt JD**, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. 2005. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer*, 114 (1):101-108.

- Imai MA**, Oda Y, Oda M, Nakanishi I, Kawahara E. 2004. Overexpression of E2F1 associated with LOH at RB locus and hyperphosphorylation of RB in non-small cell lung carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 130 (6):320-326.
- Iwabuchi H**, Sakamoto M, Sakunaga H, Ma YY, Carcangiu ML, Pinkel D, Yang-Feng TL, Gray JW. 1995. Genetic analysis of benign, low-grade, and high-grade ovarian tumors. *Cancer Res*, 55 (24):6172-6180.
- Jiang F**, Richter J, Schraml P, Bubendorf L, Gasser T, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H. 1998. Chromosomal imbalances in papillary renal cell carcinoma: genetic differences between histological subtypes. *Am J Pathol*, 153 (5):1467-1473.
- Jocham D**, Richter A, Hoffmann L, Iwig K, Fahlenkamp D, Zakrzewski G, Schmitt E, Dannenberg T, Lehmacher W, von Wietersheim J, Doehn C. 2004. Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised controlled trial. *Lancet*, 363 (9409):594-599.
- Kabat GC**, Silvera SA, Miller AB, Rohan TE. 2007. A cohort study of reproductive and hormonal factors and renal cell cancer risk in women. *Br J Cancer*, 96 (5):845-849.
- Kearney L**. 2001. Molecular cytogenetics. *Best Pract Res Clin Haematol*, 14 (3):645-669.
- Kim HL**, Seligson D, Liu X, Janzen N, Bui MH, Yu H, Shi T, Figlin RA, Horvath S, Belldegrun AS. 2004. Using protein expressions to predict survival in clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res*, 10 (16):5464-5471.
- Kimura Y**, Noguchi T, Kawahara K, Kashima K, Daa T, Yokoyama S. 2004. Genetic alterations in 102 primary gastric cancers by comparative genomic hybridization: gain of 20q and loss of 18q are associated with tumor progression. *Mod Pathol*, 17 (11):1328-1337.
- Korn WM**, Yasutake T, Kuo WL, Warren RS, Collins C, Tomita M, Gray J, Waldman FM. 1999. Chromosome arm 20q gains and other genomic alterations in colorectal cancer metastatic to liver, as analyzed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 25 (2):82-90.
- Kovacs G**, Akhtar M, Beckwith BJ, Bugert P, Cooper CS, Delahunt B, Eble JN, Fleming S, Ljungberg B, Medeiros LJ, Moch H, Reuter VE, Ritz E, Roos G, Schmidt D, Srigley JR, Störkel S, van den Berg E, Zbar B. 1997. The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J Pathol*, 183 (2):131-133.
- Kreuz M**, Rosolowski M, Berger H, Schwaenen C, Wessendorf S, Loeffler M, Hasenclever D. 2007. Development and implementation of an analysis tool for array-based comparative genomic hybridization. *Methods Inf Med*, 46 (5):608-613.
- Kunkle DA**, Eggleston BL, Uzzo RG. 2008. Excise, ablate or observe: the small renal mass dilemma--a meta-analysis and review. *J Urol*, 179 (4):1227-1233; discussion 1233-1224.

- Lam JS**, Breda A, Belldegrun AS, Figlin RA. 2006. Evolving principles of surgical management and prognostic factors for outcome in renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 24 (35):5565-5575.
- Lane BR**, Kattan MW. 2005. Predicting outcomes in renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol*, 15 (5):289-297.
- Langers AM**, Verspaget HW, Hawinkels LJ, Kubben FJ, van Duijn W, van der Reijden JJ, Hardwick JC, Hommes DW, Sier CF. 2012. MMP-2 and MMP-9 in normal mucosa are independently associated with outcome of colorectal cancer patients. *Br J Cancer*, 106 (9):1495-1498.
- Lee JE**, Spiegelman D, Hunter DJ, Albanes D, Bernstein L, van den Brandt PA, Buring JE, Cho E, English DR, Freudenheim JL, Giles GG, Graham S, Horn-Ross PL, Håkansson N, Leitzmann MF, Männistö S, McCullough ML, Miller AB, Parker AS, Rohan TE, Schatzkin A, Schouten LJ, Sweeney C, Willett WC, Wolk A, Zhang SM, Smith-Warner SA. 2008. Fat, protein, and meat consumption and renal cell cancer risk: a pooled analysis of 13 prospective studies. *J Natl Cancer Inst*, 100 (23):1695-1706.
- Lee JE**, Männistö S, Spiegelman D, Hunter DJ, Bernstein L, van den Brandt PA, Buring JE, Cho E, English DR, Flood A, Freudenheim JL, Giles GG, Giovannucci E, Håkansson N, Horn-Ross PL, Jacobs EJ, Leitzmann MF, Marshall JR, McCullough ML, Miller AB, Rohan TE, Ross JA, Schatzkin A, Schouten LJ, Virtamo J, Wolk A, Zhang SM, Smith-Warner SA. 2009. Intakes of fruit, vegetables, and carotenoids and renal cell cancer risk: a pooled analysis of 13 prospective studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18 (6):1730-1739.
- Leibovitch I**, Raviv G, Mor Y, Nativ O, Goldwasser B. 1995. Reconsidering the necessity of ipsilateral adrenalectomy during radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *Urology*, 46 (3):316-320.
- Levi F**, Ferlay J, Galeone C, Lucchini F, Negri E, Boyle P, La Vecchia C. 2008. The changing pattern of kidney cancer incidence and mortality in Europe. *BJU Int*, 101 (8):949-958.
- Lichter P**, Bentz M, Du Manoir S, Joos S. 1995. Comparative genomic hybridisation. In: Verma RS, Babu A, Hrsg. *Human Chromosomes: Principles and Techniques*. 2 Aufl. Columbus, Ohio: McGraw-Hill, 191-210.
- Lindblad P**, Chow WH, Chan J, Bergström A, Wolk A, Gridley G, McLaughlin JK, Nyrén O, Adami HO. 1999. The role of diabetes mellitus in the aetiology of renal cell cancer. *Diabetologia*, 42 (1):107-112.
- Linehan WM**, Lerman MI, Zbar B. 1995. Identification of the von Hippel-Lindau (VHL) gene. Its role in renal cancer. *JAMA*, 273 (7):564-570.
- Ljungberg B**. 2007. Prognostic markers in renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol*, 17 (5):303-308.

- Ljungberg B. 2012.** Guidelines on Renal Cell Carcinoma European Association of Urology.
- Ljungberg B,** Cowan NC, Hanbury DC, Hora M, Kuczyk MA, Merseburger AS, Patard JJ, Mulders PF, Sinescu IC, Group EAoUG. 2010. EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update. *Eur Urol*, 58 (3):398-406.
- Lonser RR,** Glenn GM, Walther M, Chew EY, Libutti SK, Linehan WM, Oldfield EH. 2003. von Hippel-Lindau disease. *Lancet*, 361 (9374):2059-2067.
- Lopez-Beltran A,** Scarpelli M, Montironi R, Kirkali Z. 2006. 2004 WHO classification of the renal tumors of the adults. *Eur Urol*, 49 (5):798-805.
- Loukopoulos P,** Shibata T, Katoh H, Kokubu A, Sakamoto M, Yamazaki K, Kosuge T, Kanai Y, Hosoda F, Imoto I, Ohki M, Inazawa J, Hirohashi S. 2007. Genome-wide array-based comparative genomic hybridization analysis of pancreatic adenocarcinoma: identification of genetic indicators that predict patient outcome. *Cancer Sci*, 98 (3):392-400.
- Mahlamäki EH,** Bärlund M, Tanner M, Gorunova L, Höglund M, Karhu R, Kallioniemi A. 2002. Frequent amplification of 8q24, 11q, 17q, and 20q-specific genes in pancreatic cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 35 (4):353-358.
- Maisonneuve P,** Agodoa L, Gellert R, Stewart JH, Bucciante G, Lowenfels AB, Wolfe RA, Jones E, Disney AP, Briggs D, McCredie M, Boyle P. 1999. Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: an international collaborative study. *Lancet*, 354 (9173):93-99.
- Margulis V,** Wood CG. 2008. The role of lymph node dissection in renal cell carcinoma: the pendulum swings back. *Cancer J*, 14 (5):308-314.
- McCredie M,** Pommer W, McLaughlin JK, Stewart JH, Lindblad P, Mandel JS, Mellemgaard A, Schlehofer B, Niwa S. 1995. International renal-cell cancer study. II. Analgesics. *Int J Cancer*, 60 (3):345-349.
- Motzer RJ,** Bacik J, Schwartz LH, Reuter V, Russo P, Marion S, Mazumdar M. 2004. Prognostic factors for survival in previously treated patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 22 (3):454-463.
- Motzer RJ,** Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Kim ST, Chen I, Bycott PW, Baum CM, Figlin RA. 2007. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 356 (2):115-124.
- Motzer RJ,** Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, Grünwald V, Thompson JA, Figlin RA, Hollaender N, Urbanowitz G, Berg WJ, Kay A, Lebwohl D, Ravaud A, Group R-S. 2008. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet*, 372 (9637):449-456.

- Nogueira M**, Kim HL. 2008. Molecular markers for predicting prognosis of renal cell carcinoma. *Urol Oncol*, 26 (2):113-124.
- Olshen AB**, Venkatraman ES, Lucito R, Wigler M. 2004. Circular binary segmentation for the analysis of array-based DNA copy number data. *Biostatistics*, 5 (4):557-572.
- Pesch B**, Haerting J, Ranft U, Klimpel A, Oelschlägel B, Schill W. 2000. Occupational risk factors for renal cell carcinoma: agent-specific results from a case-control study in Germany. MURC Study Group. Multicenter urothelial and renal cancer study. *Int J Epidemiol*, 29 (6):1014-1024.
- Poincloux R**, Al Saati T, Maridonneau-Parini I, Le Cabec V. 2009. The oncogenic activity of the Src family kinase Hck requires the cooperative action of the plasma membrane- and lysosome-associated isoforms. *Eur J Cancer*, 45 (3):321-327.
- RKI, GEKID**. 2012. Krebs in Deutschland 2007/2008. Berlin: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg).
- Rosner I**, Bratslavsky G, Pinto PA, Linehan WM. 2009. The clinical implications of the genetics of renal cell carcinoma. *Urol Oncol*, 27 (2):131-136.
- Ross JS**, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L, Bloom KJ. 2003. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist*, 8 (4):307-325.
- Sanjmyatav J**, Schubert J, Junker K. 2005. Comparative study of renal cell carcinoma by CGH, multicolor-FISH and conventional cytogenetic banding analysis. *Oncol Rep*, 14 (5):1183-1187.
- Sanjmyatav J**, Junker K, Matthes S, Muehr M, Sava D, Sternal M, Wessendorf S, Kreuz M, Gajda M, Wunderlich H, Schwaenen C. 2011. Identification of genomic alterations associated with metastasis and cancer specific survival in clear cell renal cell carcinoma. *J Urol*, 186 (5):2078-2083.
- Sternberg CN**, Davis ID, Mardiak J, Szczylik C, Lee E, Wagstaff J, Barrios CH, Salman P, Gladkov OA, Kavina A, Zarbá JJ, Chen M, McCann L, Pandite L, Roychowdhury DF, Hawkins RE. 2010. Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol*, 28 (6):1061-1068.
- Strachan T, Read A**. 2011. Cancer Genetics. Human Molecular Genetics. 4 Aufl. New York: Garland Science, Taylor and Francis Group, LLC, 537-568.
- Tanner MM**, Tirkkonen M, Kallioniemi A, Holli K, Collins C, Kowbel D, Gray JW, Kallioniemi OP, Isola J. 1995. Amplification of chromosomal region 20q13 in invasive breast cancer: prognostic implications. *Clin Cancer Res*, 1 (12):1455-1461.
- Thompson RH**, Siddiqui S, Lohse CM, Leibovich BC, Russo P, Blute ML. 2009. Partial versus radical nephrectomy for 4 to 7 cm renal cortical tumors. *J Urol*, 182 (6):2601-2606.

- Tibiletti MG.** 2004. Specificity of interphase fluorescence in situ hybridization for detection of chromosome aberrations in tumor pathology. *Cancer Genet Cytogenet*, 155 (2):143-148.
- van der Poel HG,** Roukema JA, Horenblas S, van Geel AN, Debruyne FM. 1999. Metastasectomy in renal cell carcinoma: A multicenter retrospective analysis. *Eur Urol*, 35 (3):197-203.
- Waalkes S,** Eggers H, Rustemeier J, Wegener G, Jentzmik F, Schrader M, Hofmann R, Kuczyk MA, Schrader AJ, Nierenzelltumoren FdN. 2011. [Overweight is an advantageous prognostic marker in patients with clear cell kidney cancer]. *Urologe A*, 50 (9):1118-1124.
- Weight CJ,** Larson BT, Fergany AF, Gao T, Lane BR, Campbell SC, Kaouk JH, Klein EA, Novick AC. 2010. Nephrectomy induced chronic renal insufficiency is associated with increased risk of cardiovascular death and death from any cause in patients with localized cT1b renal masses. *J Urol*, 183 (4):1317-1323.
- Weikert S,** Boeing H, Pischon T, Weikert C, Olsen A, Tjønneland A, Overvad K, Becker N, Linseisen J, Trichopoulou A, Mountokalakis T, Trichopoulos D, Sieri S, Palli D, Vineis P, Panico S, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, Verschuren WM, Ljungberg B, Hallmans G, Berglund G, González CA, Dorronsoro M, Barricarte A, Tormo MJ, Allen N, Roddam A, Bingham S, Khaw KT, Rinaldi S, Ferrari P, Norat T, Riboli E. 2008. Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am J Epidemiol*, 167 (4):438-446.
- Weikert S,** Boeing H, Pischon T, Olsen A, Tjønneland A, Overvad K, Becker N, Linseisen J, Lahmann PH, Arvaniti A, Kassapa C, Trichopoulou A, Sieri S, Palli D, Tumino R, Vineis P, Panico S, van Gils CH, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, Büchner FL, Ljungberg B, Hallmans G, Berglund G, Wirfält E, Pera G, Dorronsoro M, Gurrea AB, Navarro C, Martinez C, Quirós JR, Allen N, Roddam A, Bingham S, Jenab M, Slimani N, Norat T, Riboli E. 2006. Fruits and vegetables and renal cell carcinoma: findings from the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Int J Cancer*, 118 (12):3133-3139.
- Wittekind C.** 2002. TNM. Klassifikation maligner Tumoren. Berlin: Springer.
- Wong MP,** Fung LF, Wang E, Chow WS, Chiu SW, Lam WK, Ho KK, Ma ES, Wan TS, Chung LP. 2003. Chromosomal aberrations of primary lung adenocarcinomas in nonsmokers. *Cancer*, 97 (5):1263-1270.
- Wyllie AH.** 2002. E2F1 selects tumour cells for both life and death. *J Pathol*, 198 (2):139-141.
- Zhang SY,** Liu SC, Al-Saleem LF, Holloran D, Babb J, Guo X, Klein-Szanto AJ. 2000. E2F-1: a proliferative marker of breast neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9 (4):395-401.

- Zini L**, Perrotte P, Jeldres C, Capitanio U, Pharand D, Arjane P, Lapointe S, Montorsi F, Patard JJ, Karakiewicz PI. 2008. Nephrectomy improves the survival of patients with locally advanced renal cell carcinoma. *BJU Int*, 102 (11):1610-1614.
- Zini L**, Perrotte P, Capitanio U, Jeldres C, Shariat SF, Antebi E, Saad F, Patard JJ, Montorsi F, Karakiewicz PI. 2009. Radical versus partial nephrectomy: effect on overall and noncancer mortality. *Cancer*, 115 (7):1465-1471.
- Zisman A**, Pantuck AJ, Dorey F, Said JW, Shvarts O, Quintana D, Gitlitz BJ, deKernion JB, Figlin RA, Belldegrun AS. 2001. Improved prognostication of renal cell carcinoma using an integrated staging system. *J Clin Oncol*, 19 (6):1649-1657.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sophie Matthes
Geburtsdatum und -ort	2. März 1987 in Plauen
Familienstand	ledig

Schulische Ausbildung

08/1997 bis 07/2005	Diesterweg-Gymnasium Plauen, Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
---------------------	--

Studium

10/2005 bis 09/2007	Vorklinisches Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
10/2007 bis 01/2011	Klinisches Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
02/2011 bis 01/2012	Praktisches Jahr
05/2012	Abschluss des Studiums

Stipendien

2006 bis 2011	Stipendium des Kölner Gymnasial- und Stiftungsfonds
---------------	---

Berufliche Tätigkeit

ab 10/2012	Assistenzärztin an der Klinik für Innere Medizin des Südharz-Klinikum Nordhausen
------------	--

Jena, 30.09.2012

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Forschungslabor der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Jena angefertigt. Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die an der Entstehung meiner Dissertation mitgewirkt haben.

Insbesondere gilt mein Dank Frau Prof. Dr. med. Kerstin Junker für die Überlassung des Themas und die umfassende, kompetente Betreuung bei der experimentellen Arbeit, der Auswertung und Interpretation der Daten und der Erstellung des Manuskripts.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Frau Dr. Jimsgene Sanjmyatav für die engagierte Betreuung, die zahlreichen Anregungen und die Durchsicht des Manuskripts. Sie stand mir bei allen Fragen und Problemen stets zur Seite.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern des Forschungslabors für ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Aufnahme. Mein besonderer Dank gilt Doriana Sava und Maria Sternal für die gute Zusammenarbeit.

Dem Kölner Gymnasial- und Stiftungsfonds danke ich für den Zuschuss zu den Druckkosten und für die Förderung während meines gesamten Studiums.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinen Freundinnen Yanitsa Enke, Claudia Koch und Elisabeth Skusa für ihre Unterstützung und ihre aufmunternden Worte.

Meinem Bruder Sebastian Matthes, Connie Diettrich und meiner Mutter Cornelia Matthes danke ich für alle Unterstützung, die mir mein Studium ermöglicht hat.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Frau Prof. Dr. med. Kerstin Junker,

Frau Dr. Jimsogene Sanjmyatav,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 30.09.2012, Sophie Matthes